



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría

TESIS DOCTORAL

***Células Treg y homeostasis inmune en la infancia.
Implicaciones en distintas alteraciones inmunes
pediátricas***

Memoria presentada por

Rafael Correa Rocha

para optar al grado de

Doctor en Medicina y Cirugía

Madrid, 2014

Directores de Tesis:

Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández

Dra. M^a Isabel De José Gómez

Esta Tesis ha sido realizada en el

Laboratorio de Inmunobiología Molecular

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

El trabajo de investigación que constituye esta memoria ha sido realizado gracias a la financiación concedida por el *Fondo de Investigaciones Sanitarias* (FIS) del **Instituto de Salud Carlos III**, a través de los proyectos PS09/02618; PI06/1505 y el contrato del Programa Miguel Servet [CP07/00117].



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid



Hospital Universitario
La Paz

Comunidad de Madrid



Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

La **Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández**, Jefe de Sección Médica del Servicio de Inmunología, y Jefe del Laboratorio de InmunoBiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón;

y la **Dra. M^a Isabel de José Gómez**, Profesora Asociada del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Médico Adjunto del Servicio de Infecciosas del Hospital Infantil La Paz.

CERTIFICAN,

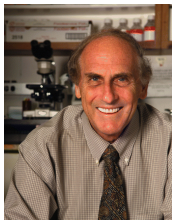
Que el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral titulada: "*Células Treg y homeostasis inmune en la infancia. Implicaciones en distintas alteraciones inmunes pediátricas*" ha sido realizado por **Rafael Correa Rocha** bajo su dirección. Revisado el trabajo, las que suscriben consideran el trabajo como satisfactorio y autorizan su presentación y defensa para optar al título de *Doctor en Medicina y Cirugía* por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 19 de Enero de 2014.

Fdo. M^a Ángeles Muñoz Fernández

Fdo. M^a Isabel de José Gómez

In Memoriam



En ciencia, es un acontecimiento raro para un investigador hacer un descubrimiento que abra un nuevo campo científico, trabajar en la vanguardia de su investigación durante cuarenta años, y vivir para ver cómo sus esfuerzos se transforman en terapias médicas que salvan vidas.

Ralph Steinman fue tal investigador. Su descubrimiento de las células dendríticas transformó la inmunología. Según decía Steinman: *"Las células dendríticas son "centinelas" que capturan los patógenos; son los "detectores" frente a la infección que utiliza sus receptores para activarse; y, una vez activadas, se convierten en los "directores" de la orquesta inmunológica en la que cada célula toca su partitura de forma armoniosa para proteger y regular el sistema inmunológico"*.

Ralph M. Steinman (1943-2011)

Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2011

Portada: Como dibujado por Miguel Ángel, una célula dendrítica alarga su brazo para impartir la chispa de vida que activa al linfocito T. (Foto de Olivier Schwartz)

A Mário y Aínhua

por mil sonrisas y abrazos

ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN/SUMMARY	XIV
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. COMPONENTES CELULARES DEL SISTEMA INMUNITARIO	5
1.1.1. La inmunidad innata	6
1.1.1.1 Células fagocíticas	7
1.1.1.2 Células NK	11
1.1.1.3 Citoquinas	12
1.1.2. La inmunidad adaptativa.....	14
1.1.2.1 Linfocitos B.....	15
1.1.2.2 Linfocitos T	16
1.2. CÉLULAS T REGULADORAS (TREG)	21
1.2.1. Definición de células Treg.....	21
1.2.2. Función de las células Treg	24
1.2.3. Papel de las células Treg en patologías asociadas al sistema inmunitario	26
1.3. EL SISTEMA INMUNITARIO EN LA INFANCIA.....	29
1.3.1. Ontogenia del sistema inmunitario. Inmunidad en neonatos	29
1.3.1.1 Función tímica y generación de los linfocitos T	30
1.3.1.2 Inmunidad en neonatos y prematuridad	31
1.3.2. El síndrome de DiGeorge como modelo de disfunción tímica.....	34
1.3.3. Alergias alimentarias durante la infancia	37
1.3.4. Papel de las células Treg en la homeostasis inmune durante la infancia	40
2. OBJETIVOS	45
3. METODOLOGÍA.....	49
3.1. POBLACIONES DE ESTUDIO Y UNIDADES PARTICIPANTES.....	49
3.1.1. Estudio en muestras de cordón de neonatos	50

3.1.2. Estudio en niños con Síndrome de DiGeorge	50
3.1.3. Estudio en niños con alergia alimentaria	51
3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	53
3.3. ANÁLISIS DE POBLACIONES INMUNES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	54
3.4. ANÁLISIS DE CÉLULAS TREG	57
3.5. ANÁLISIS DE FUNCIÓN TÍMICA (CUANTIFICACIÓN DE TRECS).....	59
3.6. CUANTIFICACIÓN EN PLASMA DE CITOQUINAS E INMUNOGLOBULINAS	61
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
4. RESULTADOS	65
4.1. ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE EN EL RECIÉN NACIDO	66
4.1.1. Valores Clínicos de Neonatos	67
4.1.2. Los Neonatos Prematuros presentan una Marcada Leucopenia	69
4.1.2.1 Proporción de poblaciones de leucocitos	69
4.1.2.2 Número absoluto de poblaciones de leucocitos	70
4.1.2.3 Proporción de subpoblaciones de linfocitos	72
4.1.2.4 Número absoluto de subpoblaciones de linfocitos	74
4.1.2.5 Proporción de subpoblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+	75
4.1.3. La proporción de células Treg está aumentada en Neonatos Prematuros	78
4.1.3.1 Frecuencia y valores absolutos de células Treg	78
4.1.3.2 Fenotipo de las células Treg	81
4.1.4. Mecanismos implicados en la producción y supervivencia de linfocitos T	83
4.1.4.1 Análisis de la Función Tímica	83
4.1.4.2 Valores plasmáticos de Interleuquina-7 (IL-7)	85
4.2. ANÁLISIS INMUNOLÓGICO EN NIÑOS CON SÍNDROME DE DiGEORGE	89

4.2.1. Déficit de linfocitos T y disfunción tímica en niños con SDG	90
4.2.1.1 Características demográficas y poblaciones inmunes en niños con síndrome de DiGeorge.....	90
4.2.1.2 Análisis de la función tímica en niños con SDG.....	92
4.2.2. Alteraciones en la homeostasis contribuyen al déficit de linfocitos T	94
4.2.3. La expresión de IL-7Rα en células TCD4+ está disminuida en niños con SDG.....	97
4.2.4. Valores y fenotipo de células Treg en niños con SDG...	99
4.3. FACTORES INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE TOLERANCIA EN NIÑOS ALÉRGICOS.....	105
4.3.1. Sujetos de estudio y adquisición de tolerancia	106
4.3.2. SOTI sólo modifica los valores de determinadas subpoblaciones de linfocitos TCD4+.....	107
4.3.2.1 Análisis de subpoblaciones de linfocitos T.....	108
4.3.2.2 Diferencias entre niños alérgicos y sanos en las poblaciones de linfocitos T.	112
4.3.3. Cambios en la población Treg en niños tratados con SOTI	115
4.3.3.1 Efecto del aumento de Treg en las células efectoras implicadas en el proceso alérgico.....	116
4.3.4. SOTI aumenta los valores plasmáticos de IgG específicas	120
4.3.5. SOTI modifica las concentraciones plasmáticas de distintas citoquinas.....	121
5. DISCUSIÓN	127
5.1. LEUCOPENIA EN NEONATOS PREMATUROS Y VALORES AUMENTADOS DE TREG.....	128
5.2. DISFUNCIÓN TÍMICA Y DESREGULACIÓN INMUNE EN NIÑOS CON SÍNDROME DE DIGEORGE	134

5.3. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE TOLERANCIA EN NIÑOS ALÉRGICOS.....	139
6. CONCLUSIONES	149
CONCLUSIONS	151
7. BIBLIOGRAFÍA.....	155
8. AGRADECIMIENTOS	167
9. PUBLICACIONES.....	173

Abreviaturas

E.E.M.	Error estándar de la media
IFN-γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleuquina-
IL-7Rα	subunidad α del receptor para IL-7
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	Célula “natural killer”
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PTK7	Proteína tirosina-kinasa 7
RTEs	<i>Recent thymic emigrants</i>
SDG	Síndrome de DiGeorge
SOTI	<i>Specific Oral Tolerance Induction</i>
TCD4+	Linfocito T CD4+
TCD8+	Linfocito T CD8+
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TREC	<i>T-cell rearrangement excision circles</i>
Treg	Células T reguladoras

Resumen

Las células T reguladoras (Treg) han cobrado un gran protagonismo en los últimos años dado su papel clave en procesos de autoinmunidad, alergias, tolerancia a trasplantes, etc. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre el papel de estas células en niños. Pensamos que la inmadurez inmunológica en las primeras etapas de vida podría afectar a la homeostasis de células Treg, lo cual podría tener repercusiones sobre la homeostasis del sistema inmune y en la incidencia de determinadas patologías de la infancia.

Esta memoria se centra principalmente en estudiar en muestras de cordón el desarrollo de Treg a lo largo de la gestación y estudiar el papel de estas células en la incidencia de alergia, u otras patologías del sistema inmune como el síndrome de DiGeorge. Los resultados del estudio han demostrado que la población de Treg se genera muy precozmente mostrando valores elevados en el neonato. Los altos niveles de Treg durante la gestación estarían implicados en permitir la tolerancia materno-fetal, pero también podrían asociarse a la linfopenia observada en neonatos, especialmente en prematuros. Los resultados también muestran que una deficiencia de Treg puede tener consecuencias a largo plazo para el correcto desarrollo del sistema inmunológico. El análisis inmunológico realizado en niños con Síndrome de DiGeorge, en los que la función tímica está alterada, demuestra una clara deficiencia en células Treg que podría asociarse con una mayor historia proliferativa y posible senescencia en la población de linfocitos T, y una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes. Por último, en esta memoria se demuestra que las Treg juegan un papel clave en los procesos alérgicos y que la desensibilización a alérgenos alimentarios en niños está asociada a una recuperación de la población Treg y de una nueva subpoblación de linfocitos T CD4 hipo-proliferativa.

Summary

Regulatory T cells [Treg] have acquired a big interest in the last years due to their pivotal role in immune disorders, such as allergy, autoimmune disorders, etc. However, there are few studies about the role of these cells in children. The immune system in children is very different to adults, and the immaturity of immune system in children could affect to the Treg population, which could have an impact in the immune homeostasis and in the incidence of some paediatric diseases.

In this study we have investigated in cord blood samples the development of Treg population during pregnancy. We also investigated the role of Treg in allergy and other pathologies of immune system such as DiGeorge syndrome. The results demonstrated that Treg are generated early during the pregnancy, and neonates born with high Treg values, notably preterm newborns. The high Treg values observed participate in the feto-maternal tolerance but could also be related to the lymphopenia observed in neonates. In addition, the results indicate that a Treg deficiency could have an impact at long term for the correct immune development. The immune analysis performed in children with DiGeorge syndrome, in which thymic function is impaired, showed a marked impairment in Treg population that could be related to the increased proliferation and senescence of T lymphocytes, and could be implicated in a higher incidence to autoimmune diseases. Finally, in this study we have also showed that Treg play a key role in allergic disorders, and the tolerance to food allergens in children is related with a recover of the Treg subset and a new hypo-proliferative population of CD4 T cells.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El término **INMUNIDAD** deriva de la palabra latina *immunitas*, término que designa la protección ofrecida a los senadores romanos como defensa frente a cualquier acción judicial durante el ejercicio de su cargo. En un sentido histórico, *immunidad* significaba protección contra la enfermedad y, más en concreto, contra una enfermedad infecciosa. Las células y las moléculas responsables de su ejecución constituyen el **sistema inmunitario** (también denominado inmunológico o inmune), y su reacción conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas se denomina **respuesta inmunitaria** [1].

La **función fisiológica del sistema inmunitario** consiste en la defensa contra los microorganismos infecciosos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede despertar una respuesta inmunitaria (sería el caso de los procesos alérgicos). Asimismo, aquellos mecanismos que en condiciones normales protegen a las personas de las infecciones y eliminan las sustancias ajenas, en algunas circunstancias también pueden reaccionar frente a moléculas propias y son capaces de provocar una lesión tisular o una enfermedad autoinmune. Por tanto, una definición más global de la respuesta inmunitaria señala que es una reacción desplegada tanto frente a microorganismos como a macromoléculas, del tipo de las proteínas y los polisacáridos, y a pequeños compuestos químicos que sean reconocidos como ajenos con independencia de las consecuencias fisiológicas o patológicas que pueda acarrear una reacción de esta clase. La **inmunología** es el estudio de las respuestas inmunitarias en este sentido más amplio, así como de los fenómenos celulares y moleculares que suceden después de que un organismo tropiece con un patógeno y con otras macromoléculas ajenas.

El principal cometido del sistema inmunitario sería por tanto proteger al individuo frente a los patógenos, y ser capaz de distinguir entre lo propio y lo ajeno, evitando las respuestas auto-reactivas o autoinmunes. Además, las respuestas inmunitarias inicialmente dirigidas frente a un patógeno pueden resultar perjudiciales para el individuo si la proliferación de estas células o la producción de señales químicas no se mantienen bajo un estricto control. Por ello, estas respuestas están sometidas a diversos mecanismos de control, que sirven para que el sistema inmunitario retorne al estado de reposo cuando la respuesta frente a un determinado antígeno se hace innecesaria. Se denominaría homeostasis inmune al equilibrio adecuado entre las distintas poblaciones y mecanismos de respuesta que componen el sistema inmunitario. Los mecanismos que conducen a esta homeostasis serían responsables por un lado de que el sistema inmunitario vuelva a su estado basal al finalizar una respuesta inmunitaria, y por otro lado de mantener constantemente los niveles adecuados de cada población inmunitaria para poder reaccionar eficazmente frente a cualquier agresión. En la homeostasis inmune participan tanto diversas poblaciones celulares que pueden ejercer tareas de control, como moléculas tales como las citoquinas que pueden tanto inhibir como estimular las respuestas inmunes o la proliferación de células.

1.1. Componentes celulares del sistema inmunitario

La primera fase de cualquier respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento del patógeno o del material extraño para poder iniciar después una reacción destinada a eliminarlo. A grandes rasgos, las respuestas inmunitarias se pueden dividir en dos categorías: las respuestas inmunitarias innatas y las respuestas inmunitarias adaptativas [2]. La **inmunidad innata** aporta la primera línea de defensa frente a los patógenos, mientras que la **inmunidad adaptativa** aparece como respuesta a una infección y se adapta a ella (Figura 1). La diferencia más importante que existe entre ambos tipos de respuesta es que las respuestas inmunitarias adaptativas presentan una alta especificidad con respecto a un determinado patógeno. Además, las respuestas innatas no se modifican tras la exposición repetida a un determinado agente infeccioso, mientras que la intensidad de las respuestas adaptativas aumenta al ir aumentando el número de exposiciones al mismo agente patógeno. Tanto las respuestas innatas como adaptativas están mediadas principalmente por los leucocitos, entre los que se distinguen diversas poblaciones con características y funciones distintas que se explicarán a continuación.

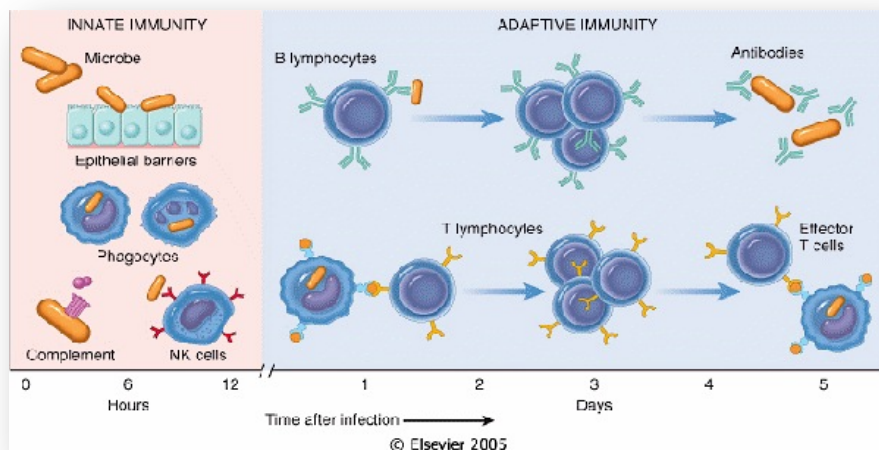


Figura 1. Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata aportan la primera línea de defensa contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas surgen más tarde y consisten en la activación de los linfocitos. (Imagen tomada de (1)).

1.1.1. La inmunidad innata

La **inmunidad innata** (también llamada inmunidad natural o espontánea) está constituida por unos mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya instaurados incluso antes de contraerse la infección, y preparados para responder con rapidez una vez producida (Figura 2). Estos mecanismos sólo reaccionan ante los patógenos (y los derivados de las células dañadas), y responden básicamente de la misma manera cada vez que se repite una infección. Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes: 1) barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies; 2) células fagocíticas (granulocitos,

macrófagos] y linfocitos citotóxicos naturales o “*natural killer*” [NK]; 3) proteínas sanguíneas, como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) unas proteínas denominadas citoquinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células inmunitarias.

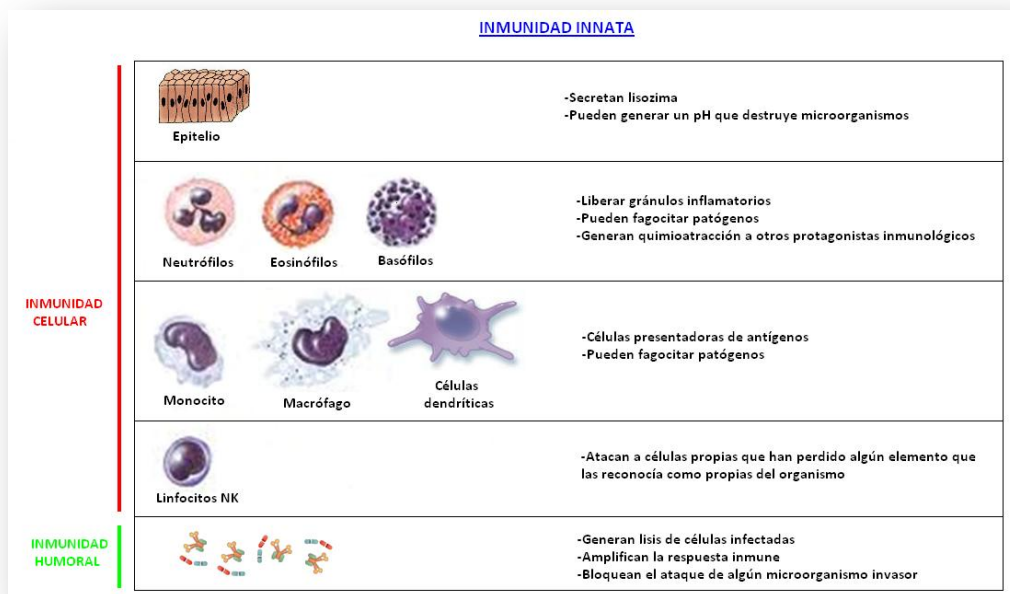


Figura 2. Componentes principales de la inmunidad innata.

1.1.1.1 Células fagocíticas

Un grupo importante de leucocitos son las células fagocíticas, entre las que se encuentran los monocitos, los macrófagos y los granulocitos (también llamados polimorfonucleares). Estas células se unen a los microorganismos, los ingieren y los destruyen. Como los sistemas de reconocimiento que utilizan son primitivos y carentes de especificidad, y les permiten unirse a una amplia variedad de

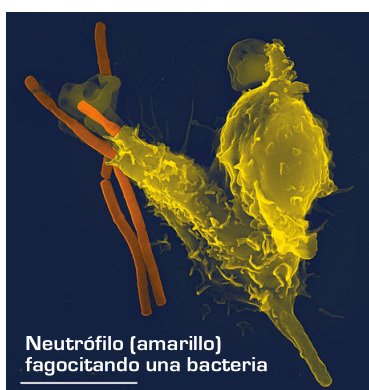
productos microbianos, estos leucocitos son mediadores de respuestas inmunitarias innatas [1, 2].

Los fagocitos mononucleares.

El grupo más importante de células fagocíticas de vida larga pertenece a la estirpe de los fagocitos mononucleares. Todas estas células proceden de las células madre de médula ósea, y su misión es capturar, ingerir y destruir partículas, entre las que se encuentran los agentes infecciosos. Para ello, las células fagocíticas se encuentran situadas estratégicamente en lugares en los que tienen mayores posibilidades de capturar dichas partículas. Por ejemplo, las *células de Kupffer* recubren los sinusoides hepáticos, a través de los que fluye la sangre, mientras que las *células A sinoviales* recubren la cavidad sinovial. Las células de esta estirpe que circulan en la sangre se denominan **monocitos**. En un momento dado, estas células migran hacia los tejidos, en donde se transforman en **macrófagos** tisulares. Estas células presentan antígenos a los linfocitos T muy eficazmente, aunque la célula que desempeña con mayor eficacia esta función de presentación de antígenos a las células T es otro tipo de fagocito mononuclear que es la célula dendrítica. Las **células dendríticas** cumplen un cometido importante en las respuestas innatas a las infecciones, concretamente las células dendríticas plasmocitoides están especializadas en la respuesta celular temprana a las infecciones víricas. Estas células reconocen virus endocitados y producen interferones de tipo 1, que poseen una potente actividad antivírica. Además, las células dendríticas desempeñan una misión decisiva en las respuestas de la inmunidad adaptativa al capturar los antígenos microbianos y presentárselos a los linfocitos T.

Los granulocitos.

Los granulocitos son células de la sangre caracterizadas por la manera en que se colorean los orgánulos de su citoplasma. Se les conoce como leucocitos polimorfonucleares, debido a las formas variables de núcleo que pueden presentar. Sin embargo, este término no es del todo adecuado ya que sólo es correcto para los neutrófilos y no para los basófilos ni los eosinófilos. Existen tres tipos de granulocitos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Sus nombres derivan de las características coloraciones que adoptan por la sustancia que se utiliza para colorear los orgánulos de la célula.



Los **neutrófilos** constituyen el tipo de leucocito más abundante en sangre en el ser humano, representando en torno al 45-75% del total de células. Su principal función es la fagocitosis de bacterias y hongos. Es una célula muy móvil y su consistencia “gelatinosa” le facilita atravesar las paredes de los vasos sanguíneos para migrar hacia los tejidos, ayudando en la destrucción de bacterias y hongos, y respondiendo a estímulos inflamatorios. Durante el inicio agudo de la inflamación, particularmente como resultado de la infección bacteriana, son unos de los primeros migrantes hacia el sitio de inflamación dirigidos por señales químicas como la interleuquina (IL) -8 (IL-8) o el interferón- γ (IFN- γ). La liberación de los neutrófilos desde los vasos sanguíneos esta condicionada por la liberación de histamina [producida por los mastocitos] y TNF- α [liberado por macrófagos], que actúa sobre las células del endotelio del vaso y permite el paso de los neutrófilos al tejido.

Los **eosinófilos** constituyen entre el 2-4% del total de leucocitos en sangre. Los eosinófilos interaccionan con otras células por la expresión de múltiples receptores en su superficie. Además, son células fagocitarias que demuestran especial afinidad por los complejos antígeno-anticuerpo. Los eosinófilos pueden regular la respuesta alérgica y las reacciones de hipersensibilidad mediante la neutralización de la histamina por la *histaminasa*, y a su vez producir un factor inhibidor derivado de los eosinófilos para inhibir la desgranulación de las células cebadas o de los basófilos, que contienen sustancias vasoactivas. Los eosinófilos juegan un papel de defensa frente a microorganismos no fagocitables, poseen una función citotóxica (por sus proteínas granulares), inmuno-reguladora (por las citoquinas que libera) y son capaces de participar en la reparación y remodelación tisular (liberando TGF- β). Los mecanismos de acción de los eosinófilos mejor estudiados tienen que ver con la alergia y en la defensa contra parásitos. Sus receptores para IgE permiten su fijación a los parásitos recubiertos previamente por esta inmunoglobulina, capacitándoles para destruir sus larvas, como ocurre en la *esquistosomiasis* o *bilharziasis*.

Los **basófilos** son el tipo celular menos abundante en sangre constituyendo en torno al 0,5% del total de leucocitos. Tienen una participación activa en la respuesta inflamatoria, a través de la liberación de histamina, serotonina en bajas concentraciones, y otras sustancias químicas, además de poseer receptores para el fragmento Fc de la IgE, que es determinante en los procesos alérgicos. Se considera que los basófilos serían los responsables del inicio de la respuesta alérgica.

1.1.1.2 Células NK

Las células *natural killer* o NK son una estirpe celular relacionada con los linfocitos, que reconoce las células infectadas o células tumorales y responde mediante su destrucción directa y la secreción de citoquinas inflamatorias (1). Esta población constituye el 5-20% de las células mononucleares presentes en sangre. Estas células no destruyen los microorganismos patógenos directamente, teniendo una función más relacionada con la destrucción de células infectadas o que puedan ser cancerígenas (Figura 3). No son células fagocíticas. Destruyen las otras células a través del ataque a su membrana plasmática, provocando una difusión de iones y agua hacia el interior de la célula que aumenta su volumen interno hasta un punto de ruptura en el cual ocurre la lisis. Las células asesinas tienen la capacidad de reconocer células infectadas por un virus, o las células tumorales que han sufrido transformaciones malignas. Son capaces de identificar qué células son propias del hospedador y cuales son foráneas. Esto ocurre debido a que los receptores de membrana de la célula NK detectan la presencia de las moléculas del *complejo mayor de histocompatibilidad* (MHC) de clase 1 o moléculas de histocompatibilidad en este tipo de células dañadas, y receptores inhibidores en las células sanas. Este sistema sencillo de reconocimiento de las células sanas y de las células dañadas es muy eficaz. Además de la eliminación directa de células infectadas, las NK producen IFN- γ , que activa a los macrófagos para suprimir los patógenos ingeridos. A tenor de su fenotipo de superficie y estirpe, las NK no son ni linfocitos T ni B, ni tampoco expresan receptores del antígeno de distribución clonal, como las inmunoglobulinas o los receptores de los linfocitos T (TCR). La activación de las células NK está regulada por un equilibrio entre las señales generadas a partir de los receptores activadores, que reconocen sus ligandos sobre las células agredidas y estimulan la *tirosina kinasa*, y de los receptores inhibidores que reconocen las moléculas de clase 1 del MHC y

activan la *tirosina fosfatasa*. La expansión de las células NK y su funcionalidad también puede ser inducida o estimulada por las citoquinas IL-15 e IL-12.

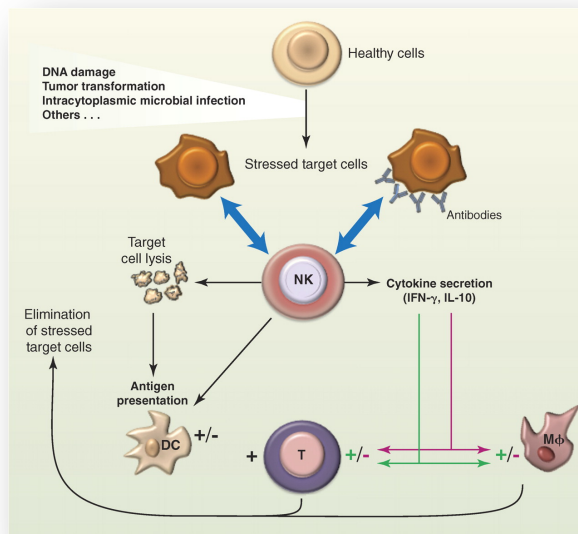


Figura 3. Función de las células NK en la destrucción de células infectadas o dañadas.

1.1.1.3 Citoquinas

Las citoquinas son moléculas diversas que transmiten señales entre los linfocitos, los fagocitos y otras células del organismo. El término citoquina se aplica a un gran número de moléculas diferentes, cuya misión es transmitir señales entre células en el curso de una respuesta inmunitaria. Todas las citoquinas son proteínas o péptidos, y algunas llevan adosados azúcares (glicoproteínas). Las citoquinas se pueden clasificar en distintos grupos (2):

Interferones (IFN). Estas citoquinas son especialmente importantes para evitar la diseminación de ciertas infecciones

víricas. Algunos interferones (IFN- α e IFN- β) son producidos por la propia célula infectada; el IFN- γ es producido por determinadas células T activadas. Los IFN inducen resistencia frente a los virus en las células de los tejidos no infectados. Se producen en las fases iniciales de la infección y constituyen la primera línea de defensa frente a muchos virus.

Interleuquinas (IL). Las interleuquinas son un extenso grupo de citoquinas (desde la IL-1 a la IL-35) que son producidas fundamentalmente por las células T, aunque los monocitos y algunas células tisulares también producen algunas de ellas. Ejercen funciones muy variadas, pero la misión de la mayoría de ellas es inducir la proliferación y diferenciación de otras células. Cada interleuquina actúa sobre un tipo de células concreto, que expresan los receptores adecuados para esa interleuquina.

Factores estimuladores de colonias (CSF). Los CSF (del inglés *colony stimulating factors*) intervienen en la multiplicación y diferenciación de las células madre de médula ósea y de los precursores de los leucocitos. La proporción de los distintos tipos de células que se producen en un momento dado depende, en parte, de la proporción de los diferentes CSF presentes. Algunos CSF también promueven procesos de diferenciación posteriores, que se producen una vez que las células han abandonado la médula ósea.

Otras citoquinas. Entre éstas se encuentran los factores de necrosis tumoral TNF- α y TNF- β (del inglés *tumour necrosis factor*), que ejercen diversos efectos, aunque son especialmente importantes en las reacciones inflamatorias y citotóxicas.

1.1.2. La inmunidad adaptativa

A diferencia de la inmunidad innata, las **respuestas inmunitarias adaptativas** son estimuladas por la exposición a los microorganismos infecciosos, y su magnitud y capacidad defensiva crece con cada exposición sucesiva a un patógeno determinado [1]. Es decir, el sistema inmunitario adaptativo “recuerda” al agente infeccioso, y es capaz de impedir que provoque una enfermedad. Por ejemplo, en el caso de enfermedades como el sarampión y la difteria, se producen respuestas adaptativas que inducen una inmunidad frente a la enfermedad que persiste durante el resto de la vida del individuo. El sistema inmunitario adaptativo tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas y de reaccionar frente a ellas. Además, posee unas dotes extraordinarias para distinguir entre los distintos microorganismos y moléculas, incluso los muy afines entre sí, y por esta razón también recibe la denominación de **inmunidad específica**. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los **linfocitos** y sus productos de secreción, como los anticuerpos (Figura 4). En cambio, las sustancias ajenas que suscitan una respuesta inmunitaria específica o que constituyen el blanco de tales respuestas se denominan **antígenos**.

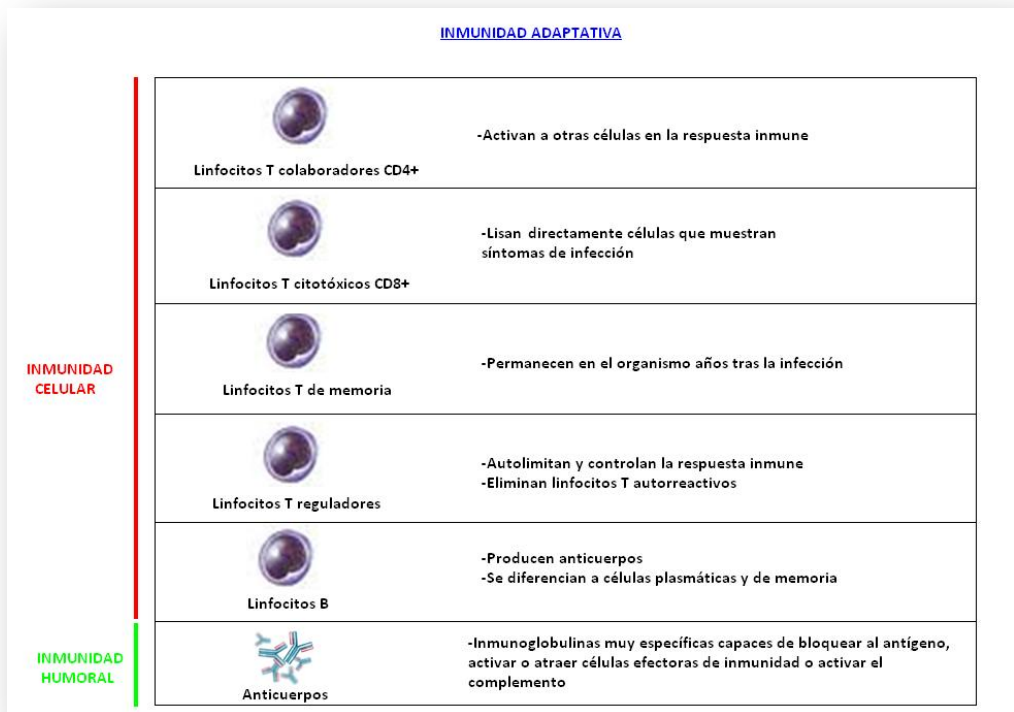


Figura 4. Componentes principales de la inmunidad adaptativa.

1.1.2.1 Linfocitos B

Los linfocitos B constituyen el 5-15% del conjunto de linfocitos circulantes, son las únicas células capaces de producir anticuerpos, y son por tanto las responsables de la inmunidad humoral [1, 2]. Los **anticuerpos** reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la capacidad patógena de los microorganismos y los marcan como una diana para su eliminación por diversos mecanismos efectoras. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas, debido a que los anticuerpos segregados pueden unirse a ellos y contribuir a su destrucción. La respuesta de los linfocitos B a los antígenos requiere la llegada de

unas señales activadoras procedentes de los linfocitos T CD4+. Los linfocitos B ingieren los anticuerpos, los degradan y exhiben sus péptidos ligados a las moléculas del MHC para su reconocimiento por parte de los linfocitos T CD4+ que a continuación activan a los propios linfocitos B. Tras su activación, una parte de la descendencia que procede de los clones expandidos de linfocitos B prolifera y se diferencian en células plasmáticas que segregan diversas clases de anticuerpos. Los antígenos de tipo polisacárido o lipídicos estimulan principalmente la secreción de anticuerpos de clase IgM. Los antígenos proteínicos, inducen la producción de anticuerpos de tipo IgG, IgA o IgE. Los anticuerpos IgG recubren a los microorganismos y los marcan para favorecer su fagocitosis, ya que los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) expresan receptores para las IgG. La IgG también es capaz de atravesar la placenta confiriendo protección al neonato hasta que su sistema inmunitario sea maduro.

1.1.2.2 Linfocitos T

Los linfocitos T o células T son los principales mediadores de la inmunidad celular. Estas células presentan una especificidad restringida hacia los antígenos, reconociendo únicamente antígenos peptídicos unidos a moléculas MHC y expresados en la superficie de otras células, pero no antígenos solubles [1]. Las células T se desarrollan a partir de sus precursores en el timo, que adquieren la capacidad para reconocer antígenos mediante la adquisición de receptores de superficie específicos o TCR (del inglés *T-cell receptor*). Existen dos tipos de **TCR** bien definidos; uno es un heterodímero compuesto por dos polipéptidos (α y β) unidos por enlaces disulfuro; el otro presenta una estructura parecida, pero los polipéptidos que lo integran son γ y δ . Ambos tipos de TCR se encuentran asociados con un conjunto de cinco polipéptidos, el complejo CD3, que formaría el complejo receptor de las células T (TCR-CD3). Aproximadamente, un

90-95% de las células T sanguíneas son del tipo $\alpha\beta$, mientras que el 5-10% restante expresan $\gamma\delta$. Los linfocitos T constan de distintas poblaciones desde el punto de vista funcional; las que están mejor caracterizadas son los linfocitos T colaboradores o *Th* (del inglés *helper*) y los linfocitos T citotóxicos o *Tc*.

Los **linfocitos T colaboradores** reconocen a sus antígenos cuando están unidos a moléculas MHC de clase II y se definen por la expresión en superficie del marcador CD4, por lo que también se les denomina linfocitos T CD4 (**TCD4+**). Los linfocitos TCD4+ tras la estimulación antigénica se activan, proliferan y se diferencian a células efectoras cuya función está mediada básicamente por la producción de citoquinas. Una de las primeras respuestas de los TCD4+ consiste en la secreción de IL-2, que es un factor de crecimiento que actúa sobre los linfocitos ya activados por un antígeno y estimula su proliferación (expansión clonal). Una parte de su descendencia se diferencia en células efectoras capaces de segregar toda una colección de citoquinas distintas que actúan en distintos tipos celulares, como células B y macrófagos. Estas CD4 efectoras abandonan los órganos linfoides donde surgieron y emigran hacia los focos de infección afectados por una inflamación concomitante. Cuando las células efectoras diferenciadas vuelven a encontrarse con el patógeno asociado, quedan activadas para ejercer las funciones responsables de su eliminación. Algunos linfocitos TCD4+ producen IFN- γ , que constituye un potente activador de macrófagos, en los que induce la producción de sustancias microbicidas, favoreciendo la destrucción de los patógenos asociados al antígeno que han reconocido. Otros TCD4+ segregan citoquinas que estimulan la producción de anticuerpos de tipo IgE y activan a los eosinófilos, que tienen la capacidad de eliminar aquellos parásitos demasiado grandes para su fagocitosis.

Los **linfocitos T citotóxicos** reconocen a sus antígenos cuando están asociados a moléculas MHC de clase I y se definen por la expresión del marcador CD8, por lo que también se conocen como linfocitos T CD8 (**TCD8+**). Los linfocitos TCD8+ activados proliferan y se diferencian en linfocitos T citotóxicos encargados de destruir las células productoras de antígenos extraños, como las que están infectadas por patógenos intracelulares. Estos patógenos pueden ser virus que hayan infectado numerosos tipos celulares, o bacterias ingeridas por los macrófagos pero que han aprendido a escapar de las vesículas fagocíticas y llegar al citoplasma (donde no están al alcance de la maquinaria destructora de los fagocitos, que se encuentra básicamente restringida a las vesículas). Mediante la destrucción de las células infectadas, los linfocitos TCD8+ son capaces de eliminar los reservorios de la infección controlando su propagación.

Existen **diferentes subpoblaciones funcionales** de células TCD4+ y TCD8+ $\alpha\beta$ dependiendo de su fenotipo o su estado funcional. De esta manera se definen linfocitos T vírgenes o **naive**, que son aquellos que se han formado en el timo y todavía no se han encontrado con el antígeno, por lo que su grado de activación o actividad efectora es bajo. Los linfocitos naive al encontrarse con el antígeno se activan expresando marcadores de **activación** y pueden diferenciarse a células **efectoras** que ejercerían su función principalmente mediante la secreción de citoquinas. Parte de las células que se han activado pueden diferenciarse en células de **memoria** longevas, que son capaces de sobrevivir durante años después de la infección. Estas células son más eficaces que los linfocitos naive a la hora de combatir a los patógenos, ya que representan una reserva ampliada de linfocitos específicos frente a un antígeno en cuestión, y responden contra el antígeno con mayor rapidez y eficacia que las células indiferenciadas. Por esta razón, la generación de respuestas memoria constituye uno de los objetivos

de la vacunación. En la [Figura 5](#) se muestra un esquema de cómo se desarrolla la respuesta de linfocitos al encontrarse con el antígeno y como se generan las células memoria.

Además se pueden definir distintos tipos de linfocitos dependiendo de las citoquinas que producen. De esta manera, dentro de la población TCD4⁺ se han definido distintos patrones de secreción de citoquinas que definirían subtipos celulares con funciones diferentes. Las células de tipo **Th1** secretan IL-2, TNF- α e IFN- γ , y llevan a cabo funciones relacionadas con la citotoxicidad y las reacciones inflamatorias locales. Por tanto, estas células son importantes en la lucha contra patógenos intracelulares como virus, bacterias y parásitos. Las células de tipo **Th2** secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 y estimulan con mayor eficacia a las células B para que proliferen y produzcan anticuerpos, por lo que su función principal es la lucha frente a patógenos libres o circulantes. Más recientemente se han definido nuevos tipos de TCD4⁺ como las Th9 implicadas en la inmunidad frente a parásitos, Th17 implicadas en la inmunidad frente a bacterias extracelulares e infecciones por hongos, etc. Además dentro de la población TCD4⁺ se ha identificado una subpoblación de células que tendrían un carácter supresor de las respuestas inmunes. Estas **células T reguladoras** (Treg) juegan un papel clave en la homeostasis inmune, y dado que es uno de los principales sujetos de estudio de esta memoria se explicarán en detalle en el siguiente apartado.

Todas estas subpoblaciones celulares, subtipos y fenotipos de células naive, efectoras, memoria, etc. pueden estudiarse debido a que los distintos tipos celulares expresan marcadores en su superficie que los identifican. Tal y como se explica en el apartado 3.3, el análisis mediante citometría de flujo de estos marcadores permite cuantificar cada una de estas poblaciones.

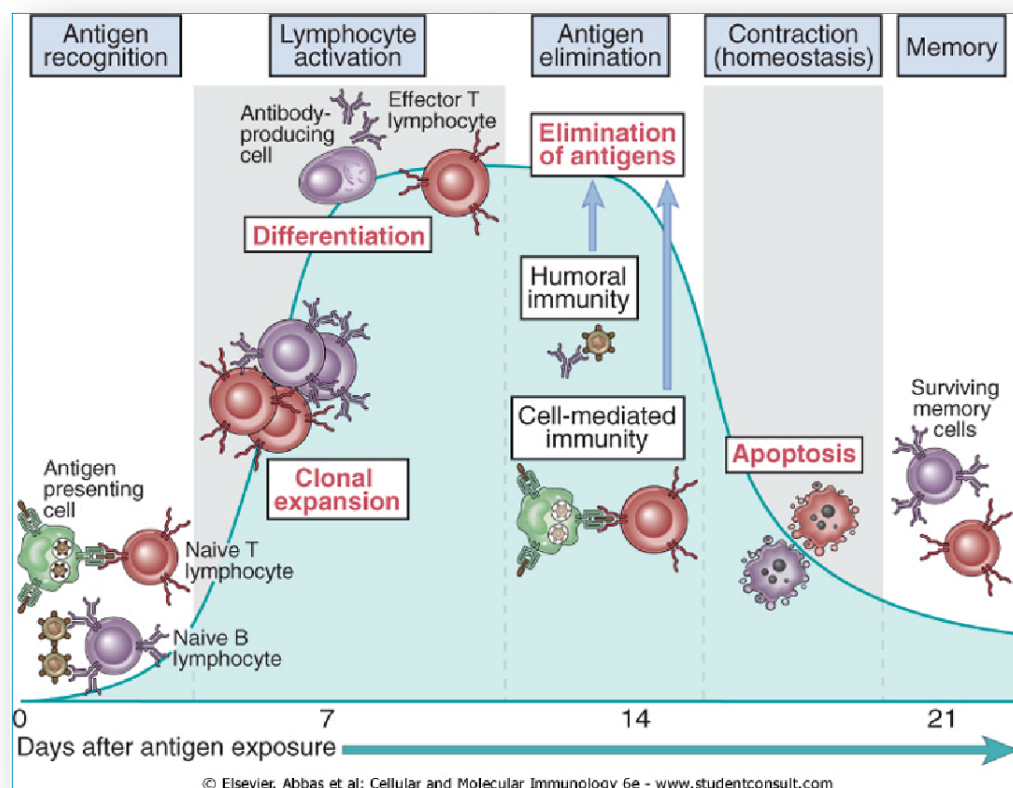


Figura 5. Fases de las respuestas inmunitarias adaptativas. (Imagen tomada de (1))

1.2. Células T reguladoras (Treg)

El principal cometido del sistema inmunitario sería por tanto proteger al individuo frente a los patógenos, y una de sus cualidades es la capacidad de distinguir entre lo propio y lo ajeno. En el timo, las células que pueden ser potencialmente auto-reactivas son eliminadas, conduciendo a la generación de un repertorio de linfocitos T en la periferia que es en general auto-tolerante. A pesar de la eficacia de esta selección negativa, en la mayoría de los individuos aparecen células auto-reactivas. Sin embargo, las enfermedades autoinmunes son infrecuentes, lo que sugiere que existen otros mecanismos capaces de controlar estas células T auto-reactivas en periferia.

1.2.1. Definición de células Treg

El control de la tolerancia periférica se mantiene gracias a mecanismos como la delección, anergia e ignorancia. Además, existen otros mecanismos de tolerancia más “activos” que operan a través de la generación de células T inmuno-reguladoras. En la actualidad está ampliamente aceptado que el sistema inmune normal posee una población de células Treg especializadas en la supresión inmunológica. Este mecanismo de supresión fue descrito por Nishizuka y Sakakura en los años 60 [3], pero no ha sido hasta mediados de los 90, cuando Sakaguchi y colaboradores las identificaron como responsables de la inhibición de la autoinmunidad, que estas células han cobrado protagonismo [4, 5]. En principio, se descubrió que algunas células TCD4⁺ eran capaces de suprimir procesos de autoinmunidad en animales normales. La caracterización de esta población de células

TCD4 capaces de suprimir la autoinmunidad reveló que expresaban constitutivamente la molécula CD25, la cual permitía distinguirlas de otras células T, estudiar su desarrollo, en particular su desarrollo tímico, y que caracterizaba su potente actividad inmunosupresora tanto *in vivo* como *in vitro*. Este marcador también permitió identificar células Treg en humanos que poseían similares características fenotípicas y funcionales.

Estudios posteriores mostraron que las células Treg CD4+CD25+ expresan de forma específica el factor de transcripción **Foxp3** [6, 7], y que alteraciones genéticas en Foxp3 son responsables de enfermedades autoinmunes e inflamatorias en roedores y humanos al afectar al desarrollo y función de las células Treg. Estos descubrimientos ponen en evidencia que las células Treg, que vendrían definidas por los marcadores **Foxp3+CD25+CD4+** (Figura 6), son un componente celular indispensable del sistema inmune normal y juegan un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de la auto-tolerancia y la homeostasis inmunológica. Estas células presentan un gran potencial, y pueden ser explotadas para su uso clínico en el tratamiento de enfermedades inmunológicas y en el control fisiológico y patológico de las respuestas inmunes [Revisado en (4, 5, 8)].

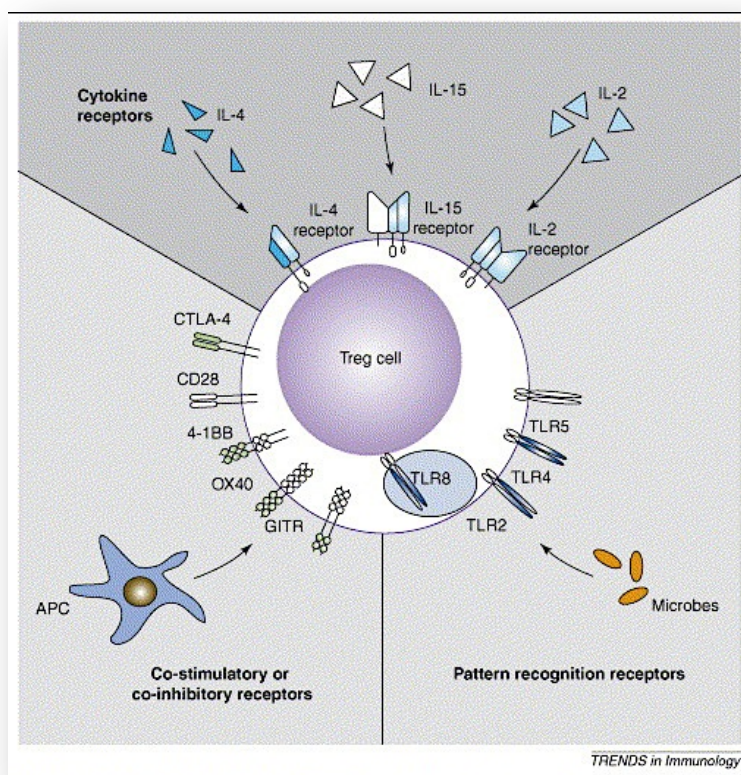


Figura 6. Marcadores y receptores para citoquinas presentes en las células Treg.

1.2.2. Función de las células Treg

En cuanto a sus **mecanismos de acción**, las células Treg suprimen la proliferación *in vivo* de las células T vírgenes y su diferenciación a células T efectoras. También pueden suprimir la función efectora de células TCD4+ y TCD8+ diferenciadas, así como la función de células NK, células B, macrófagos, osteoclastos y células dendríticas [revisado en [9, 10]]. *In vitro*, cuando se co-cultivan células Treg y células T, y se estimulan por antígeno en la presencia de células presentadoras de antígeno, las Treg suprimen la proliferación y la producción de citocinas [en particular IL-2] de las células T “respondedoras” [Figura 7].

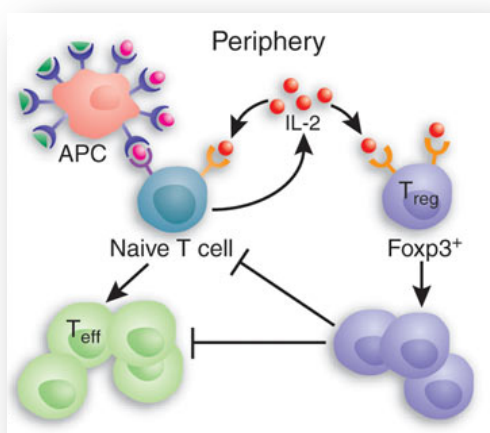


Figura 7. Papel inhibitorio de las células Treg mediado por IL-2. (Imagen tomada de Ed. Nature)

Se han descrito distintos mecanismos por los cuales las Treg ejercen su función [11] [Figura 8]: a) mediante la producción de citoquinas como TGF- β o IL-10 que ejercen un efecto supresor sobre las

células efectoras; b) la producción de moléculas como las *granzimas* que favorecerían la apoptosis de las células efectoras; c) privando a otras células de determinadas citoquinas necesarias para su supervivencia; d) inhibiendo directamente células dendríticas o presentadoras de antígeno necesarias para la activación de células efectoras.

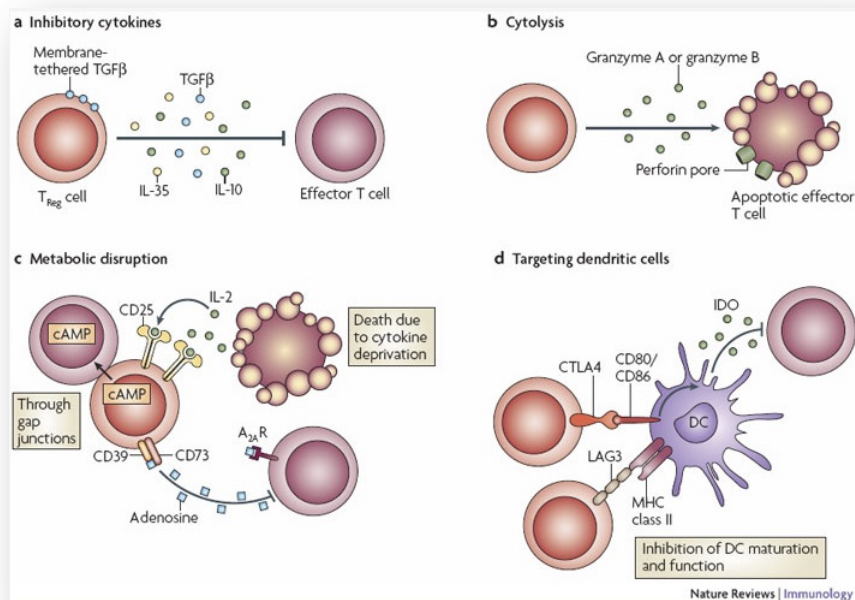


Figura 8. Mecanismos de acción de las células Treg. (Imagen tomada de (11))

1.2.3. Papel de las células Treg en patologías asociadas al sistema inmunitario

Las células Treg juegan un papel clave en el equilibrio de prácticamente todas las respuestas inmunes [Figura 9]. En adultos existen numerosos artículos que muestran hasta qué punto son cruciales las células Treg para la protección frente al desarrollo de **procesos autoinmunes**. Varios estudios muestran valores disminuidos de células Treg en sangre periférica de pacientes que sufren lupus eritematoso sistémico [12], diabetes tipo 1 [13] y artritis reumatoide [14]. Los modelos animales parecen demostrar que la deficiencia en la supresión por parte de las Treg sería la responsable de distintas enfermedades autoinmunes, y que enfermedades como IPEX (desregulación Inmune, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al X) se deben directamente a una mutación en Foxp3 y a la deficiencia de Treg [15].

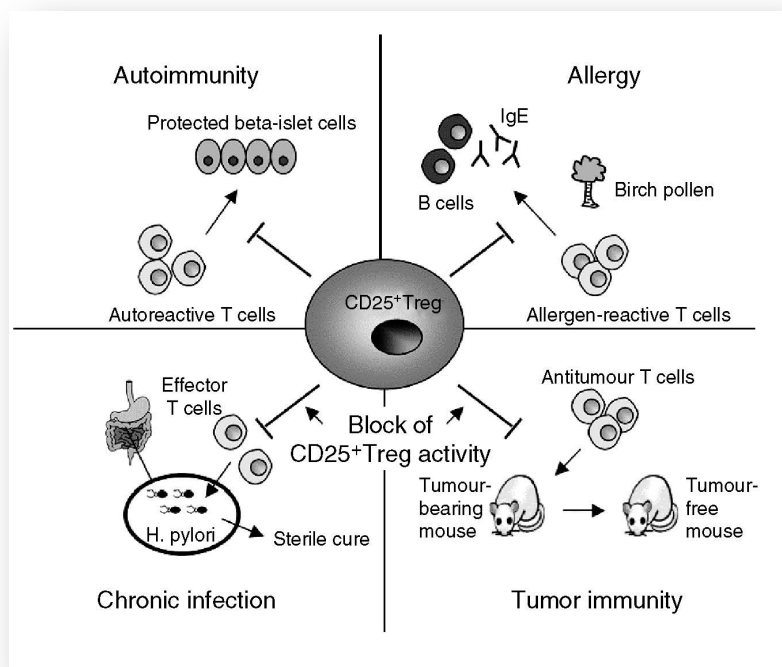


Figura 9. Función Treg. Las células Treg ejercen funciones diversas en distintas patologías asociadas al sistema inmunitario.

Otro proceso patológico en el que las Treg parecen jugar un papel clave es en los **procesos alérgicos** (Figura 9). Existen ejemplos como la enfermedad IPEX que sugieren que las Treg juegan un papel clave en el desarrollo de tolerancia a alérgenos. Los pacientes con IPEX, que presentan una deficiencia de Treg, desarrollan habitualmente dermatitis severa, altos niveles séricos de IgE y eosinofilia [16]. Las repuestas alérgicas del sistema inmune se caracterizan por la producción de citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) que inducen la secreción de IgE alérgeno-específicas y el reclutamiento de eosinófilos. Este proceso se vería suprimido por las Treg debido a su capacidad de suprimir la producción de citocinas Th2 [17]. El papel clave de las Treg

en la tolerancia a alérgenos ha sido descrito para numerosos procesos alérgicos, entre otros la alergia al polen [18], asma [19], o leche [17]. Por otro lado, las Treg han mostrado jugar un papel clave en la tolerancia o rechazo de **trasplantes**. Concretamente en el trasplante renal, diversos estudios demuestran una correlación clara entre las Treg y la tolerancia al riñón trasplantado, e incluso la utilidad de los valores de Treg como marcador diagnóstico o pronóstico [20-22].

El interés suscitado por las Treg y el gran número de estudios realizados ha revelado que la actividad de las Treg no es siempre beneficiosa. Se ha descrito que las Treg inhiben las respuestas inmunes frente a antígenos tumorales, favoreciendo por tanto el **crecimiento tumoral** [23, 24]. Los procesos infecciosos constituyen otra de las situaciones donde las Treg podrían tener un efecto perjudicial sobre la inmunidad. Se ha observado que las Treg pueden interferir en la respuesta inmune frente a **infecciones** por virus, bacterias y parásitos [25] realizando un papel dual ([Figura 9](#)). Por un lado pueden tener un efecto protector limitando la inflamación asociada a la infección [26], y por otro lado pueden suprimir las respuestas específicas frente al patógeno [27]. Por tanto, dependiendo del patógeno en cuestión, un aumento o una disminución en la actividad de las Treg será deseable para desarrollar una respuesta inmune apropiada.

Resumiendo el papel de estas Treg, podemos decir que su acción es beneficiosa en algunas respuestas inmunes incluyendo autoinmunidad, alergia y tolerancia a trasplantes. Sin embargo, la acción de las Treg también puede suprimir las respuestas específicas frente a patógenos y antígenos tumorales, y bloqueando el efecto de las Treg se puede aumentar las respuestas inmunes frente a estos antígenos. Si bien el papel de las Treg está siendo estudiado de forma exhaustiva en adultos, existen muy pocos trabajos que analicen la función de estas células en niños [28-30].

1.3. El sistema inmunitario en la infancia

Numerosos estudios comparativos demuestran que existen grandes diferencias, en cuanto a las características y funcionalidad del sistema inmune, entre niños y adultos. La inmadurez del sistema inmune en las primeras etapas de la vida hace que los niños, sobre todo los neonatos, sean más propensos a padecer infecciones. Sin embargo, la gran capacidad de regeneración y producción de nuevas células en los niños (principalmente de células T producidas por el timo) también permiten que el sistema inmunitario del niño se adapte, madure y finalmente sea incluso más eficaz que el de adultos. Un ejemplo de esta capacidad de regeneración es el caso de los niños infectados por el VIH, en los cuales el virus ha aniquilado gran parte de la población TCD4+, que constituye su célula diana. Se ha observado que en estos niños, una vez controlada la carga viral mediante los fármacos antirretrovirales, se produce un marcado aumento de la producción tímica de nuevas células T que consigue reconstituir la población de TCD4+ [31-34].

Por todo ello, las patologías, los parámetros inmunológicos y las respuestas inmunitarias en niños puedan llegar a ser muy distintas de las observadas en adultos.

1.3.1. Ontogenia del sistema inmunitario. Inmunidad en neonatos

La eficacia del sistema inmunitario depende de las interacciones entre muchos componentes celulares y humorales que se desarrollan en diferentes momentos a lo largo de la vida fetal y poco tiempo

después del nacimiento. Muchas de las células que participan en las respuestas inmunitarias proceden de las células madre hematopoyéticas no diferenciadas [Figura 10]. Al ser sometidas a factores microambientales, como interacciones célula-célula y la presencia de citoquinas solubles o unidas a membrana, estas células dan lugar a las distintas estirpes celulares [2].

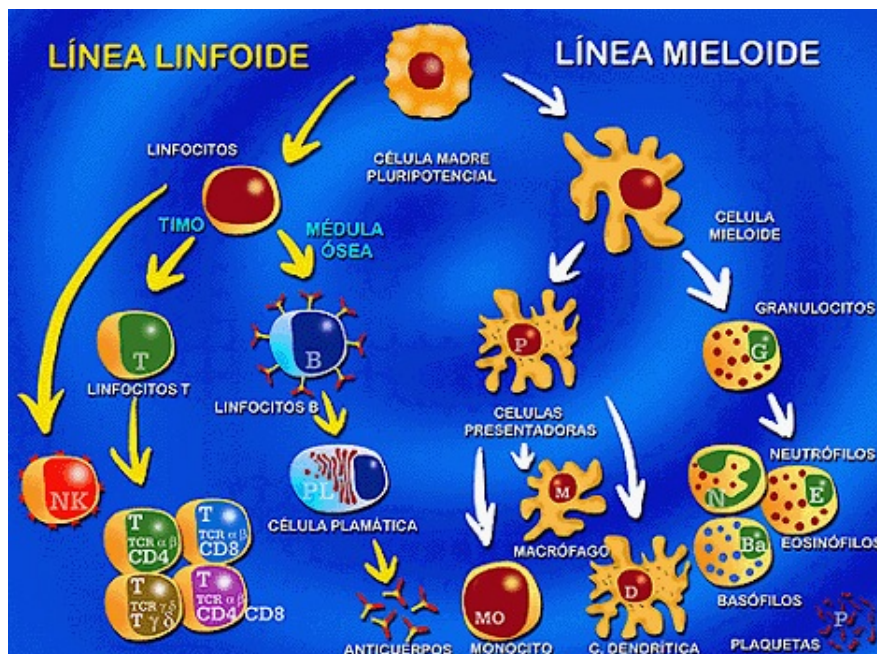


Figura 10. Origen de las células del sistema inmunitario.

1.3.1.1 Función tímica y generación de los linfocitos T

Los **linfocitos T** se forman a partir de células precursoras que migran desde la médula ósea hasta el timo, donde estos precursores llamados timocitos, proliferan y se diferencian en linfocitos T. En esta diferenciación se producen cambios fenotípicos y el reordenamiento de genes que dan lugar al receptor de la célula T (TCR) que permite

el reconocimiento antigénico. El **timo** es por tanto el órgano linfoide primario responsable de la formación de linfocitos T maduros y está constituido por numerosos lóbulos, cada uno de los cuales presenta dos zonas claramente diferenciadas, la corteza o córtex y otra zona más interna o médula tímica. El repertorio TCR se establece en las primeras etapas de vida y se estima que contiene alrededor de 10^8 especificidades distintas. Las células formadas en el timo colonizan el sistema inmunológico periférico como linfocitos T virgen o naïve. Tras la respuesta inmune, en la cual los linfocitos T ejercen su papel colaborador (TCD4+) o citotóxico (TCD8+), estas células mueren o se diferencian en linfocitos memoria.

En humanos, el timo está completamente formado antes del nacimiento. El grado de producción de linfocitos T por el timo es máximo antes del periodo de pubertad, tras el cual comienza a sufrir una involución asociada a la edad [35-37]. A pesar de que el timo es funcional en las primeras etapas de vida, se considera que el sistema inmunitario es inmaduro. Esto se debe probablemente a que los linfocitos todavía no se han encontrado con antígenos, y por tanto no se ha generado todavía la memoria inmunológica. De hecho, los neonatos o los niños de corta edad son especialmente propensos a padecer infecciones y otras alteraciones asociadas a una menor eficacia del sistema inmunitario.

1.3.1.2 Inmunidad en neonatos y prematuridad

El desarrollo de la neonatología y los avances tecnológicos empleados en el cuidado de neonatos ha incrementado de forma marcada la supervivencia de neonatos muy prematuros. Gracias a estos avances, hoy en día se consigue que salgan adelante neonatos con menos de 28 semanas de gestación o con un peso al nacer de menos de 1500 gr [38]. Sin embargo, el riesgo relativo de muerte

neonatal es mucho mayor en **neonatos prematuros** que en los neonatos nacidos a término, y la prematuridad se ha convertido en la principal causa de morbilidad y mortalidad perinatal [39, 40]. Junto con la edad gestacional, el bajo peso al nacer también se ha asociado con una mayor mortalidad y morbilidad prenatal [41]. Entre las causas responsables de esta alta mortalidad, la **sepsis neonatal** y la displasia broncopulmonar constituyen las causas más frecuentes de muerte en neonatos prematuros [40]. De hecho, los factores más importantes que predisponen a padecer infecciones son la prematuridad y el bajo peso al nacer. Un estudio reciente en un total de 9575 neonatos prematuros con edades gestacionales entre 22 y 28 semanas y un peso entre 401-1500 gr describe ratios de sepsis temprana del 6%, y de un 58 % en el caso de sepsis tardías [40].

A pesar de que las infecciones son una de las principales causas de mortalidad perinatal, existen muy pocos datos sobre la **inmunidad en neonatos** prematuros y la capacidad de su sistema inmunitario para combatir las infecciones. Los trabajos de varios autores muestran diferencias en cuanto al fenotipo de las subpoblaciones de linfocitos y diferencias en la funcionalidad de linfocitos al comparar neonatos sanos, niños y adultos [42-44]. En cuanto a neonatos prematuros no hay apenas estudios detallados sobre su inmunidad y se asume que estos niños presentan respuestas inmunitarias inmaduras. Sin embargo, no hay datos sobre las diferencias cuantitativas en poblaciones inmunes que puede haber entre los neonatos prematuros y los nacidos a término, las cuales podrían tener una gran relevancia en la susceptibilidad a infecciones de estos niños.

Además, las células Treg pueden jugar un papel clave en la homeostasis inmune de neonatos. Se ha descrito que las Treg, dado su carácter supresor, son cruciales en mantener la tolerancia materno-fetal y sus valores están aumentados durante el embarazo

[45, 46]. Sin embargo, no hay datos sobre los valores de estas Treg en neonatos, particularmente en prematuros, y sobre su potencial papel en la homeostasis inmune durante este periodo de vida. Por todo ello, uno de los objetivos de esta Tesis ha sido realizar un análisis exhaustivo de las poblaciones inmunes (incluyendo las células Treg) en neonatos prematuros y nacidos a término, para establecer sus diferencias y determinar si la alta incidencia de infecciones en prematuros podría deberse a una deficiencia en alguna de las poblaciones inmunitarias. Además, el poder analizar los valores de Treg en muestras provenientes de neonatos a distintas edades de gestación nos ha permitido estudiar la ontogenia de esta población, y establecer si las Treg presentan valores adecuados desde el nacimiento, o por el contrario es una población que se genera de forma tardía en la infancia.

1.3.2. El síndrome de DiGeorge como modelo de disfunción tímica

Como se ha comentado en el apartado anterior, los linfocitos T tienen un origen tímico, y dependen del correcto funcionamiento de este órgano para constituir todo el repertorio de linfocitos T necesario para mantener las respuestas inmunitarias adaptativas de por vida. De hecho, la ausencia de este órgano es incompatible con la vida y los niños nacidos con una ausencia total de timo tienen una esperanza de vida inferior a un año. Existen otras patologías en las que el tejido tímico está disminuido, o incluso situaciones en las que parte del tejido tímico es extirpado, como es el caso de determinadas cirugías cardíacas donde se elimina parte del timo para facilitar el acceso al corazón. En estas circunstancias, cabe esperar que la producción tímica de linfocitos T estará disminuida, y que ello podría entrañar problemas para constituir un repertorio adecuado de linfocitos T y para la correcta homeostasis inmunológica. Además, en una situación de disfunción tímica es de esperar que la población Treg estará disminuida al tener origen tímico, y su estudio puede permitir establecer qué efectos puede ocasionar una deficiencia de células Treg durante la infancia.

Un modelo de disfunción tímica es el síndrome de la delección 22q11.2 [Figura 11], que engloba anomalías conocidas con nombres diversos: **síndrome de DiGeorge**, síndrome velocardiofacial, anomalía conotruncal o síndrome cardiofacial de Cayler. Este síndrome es uno de los defectos genéticos más frecuentes en neonatos afectando a 1 de cada 4000 nacidos vivos [47]. A pesar de la heterogeneidad entre pacientes, existen síntomas comunes que afectan a la cara, cerebro, timo, glándulas paratiroides, corazón y aorta [48]. Independientemente de otras manifestaciones clínicas, la hipoplasia tímica se observa en más del 80% de los pacientes con la delección 22q11.2. Como consecuencia de esta disfunción tímica y su efecto en el desarrollo de

timocitos, los pacientes con esta delección presentan diversos defectos a nivel inmunológico [49].

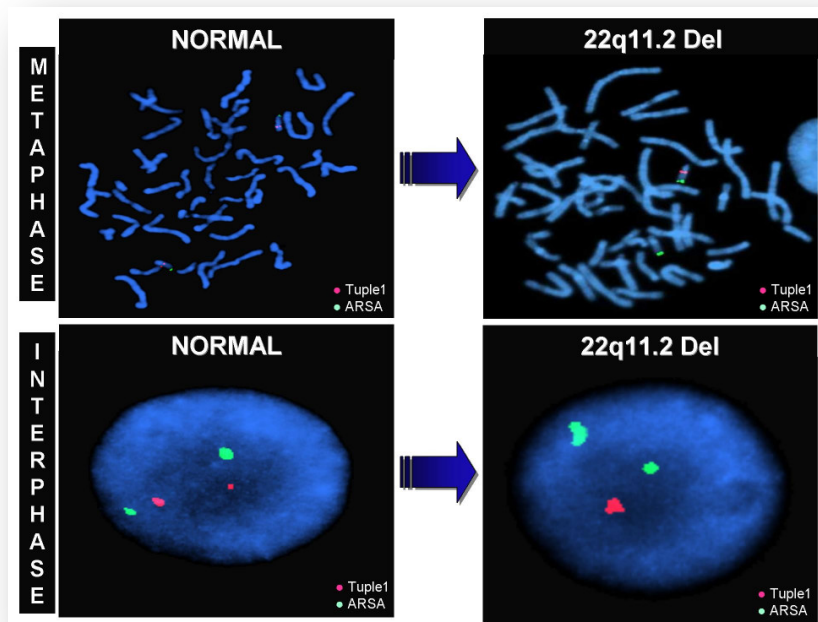


Figura 11. Síndrome de la delección 22q11.2. La delección en el cromosoma 22 se determina mediante técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Los pacientes totalmente atímicos (menos del 0,5% de los individuos con la delección), presentan una inmunodeficiencia combinada severa y alteraciones clínicas como infecciones virales permanentes a nivel respiratorio y digestivo, y defectos en el desarrollo [50]. Los pacientes con una afectación más benigna de este síndrome tienen un mejor pronóstico clínico y pueden presentar hipoplasia tímica y una deficiencia moderada de linfocitos T, aunque la cantidad de células T no ha demostrado ser un marcador predictivo de infecciones ni de

progresión clínica [48, 51, 52]. Es interesante indicar que al alcanzar la edad adulta, los valores de linfocitos T en estos pacientes con una afectación moderada permanecen dentro de la media, pero estas células presentan alteraciones como telómeros más cortos y una expansión oligoclonal en la población de células T naive [52], lo cual es indicativo de una desregulación de la homeostasis inmunológica.

Parte de los pacientes diagnosticados con el síndrome de DiGeorge no presentan ningún síntoma clínico, ni enfermedades infecciosas o desórdenes inmunológicos. A pesar de permanecer asintomáticos clínicamente, se desconoce si en estos pacientes se produce un desarrollo adecuado del sistema inmunitario, o si por el contrario presentan alteraciones que en la edad adulta puedan comprometer su capacidad inmunológica. De hecho, se ha descrito que existe una alta incidencia de enfermedades autoinmunes en pacientes con DiGeorge [53], lo cual resulta paradójico al tratarse de enfermedades asociadas a una respuesta exacerbada de células inmunes en pacientes con una deficiencia de las mismas. Una de las posibles causas de este hecho es el papel clave que han demostrado las células Treg en el control de las respuestas autoinmunes [54]. Una deficiencia de Treg a causa de la disfunción tímica podría estar detrás de la alta prevalencia de desórdenes autoinmunes en estos pacientes. Además, el estudio de pacientes con este síndrome constituiría un modelo idóneo para determinar qué efectos puede tener una deficiencia en la población Treg sobre la homeostasis y el desarrollo inmunológico en la infancia.

1.3.3. Alergias alimentarias durante la infancia

El término **hipersensibilidad** se aplica a las situaciones en las que se produce una respuesta inmunitaria adaptativa exagerada o inadecuada, que a veces llegan a provocar reacciones inflamatorias y lesiones tisulares. Estas reacciones pueden ser producidas por muchos antígenos; los agentes con capacidad para provocar hipersensibilidad son diferentes en cada individuo. Estas reacciones están producidas por respuestas inmunitarias a antígenos ambientales inocuos (como el polen, ácaros del polvo, alimentos, etc.), que dan lugar a la diferenciación de los linfocitos CD4+ Th2 y la síntesis de anticuerpos de tipo IgE que son específicos de estos antígenos, y que se unen a los receptores de Fc de los mastocitos y los basófilos (Figura 12). Cuando estos anticuerpos fijados a las células son entrecruzados por el antígeno, las células se activan y liberan con gran rapidez diversos mediadores que, en conjunto, provocan un aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del músculo liso bronquial y visceral e inflamación local. Esta reacción se conoce como hipersensibilidad inmediata debido a su rápida aparición, que ocurre en los minutos siguientes al contacto con el antígeno, y en la práctica clínica se denomina habitualmente **alergia** o **atopía**.

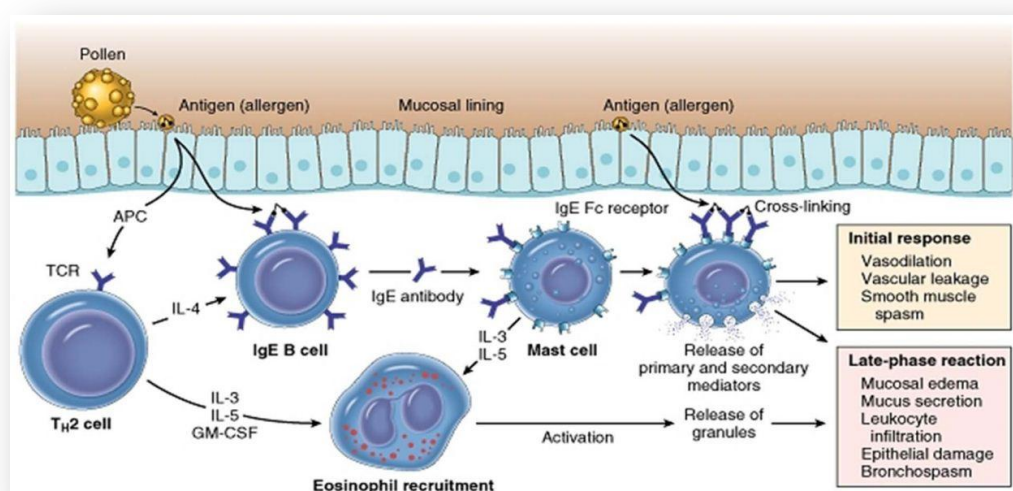


Figura 12. Mecanismos inmunológicos implicados en los procesos alérgicos.

Las **alergias alimentarias** afectan a un gran número de niños, tienen una prevalencia del 2-8 % y es la causa más frecuente de reacciones anafilácticas durante la infancia [55]. Estudios recientes sugieren que las alergias frente a huevo y leche son ahora mucho más persistentes al final de la infancia y en la adolescencia [56]. Sin embargo, en los últimos años se han implementado protocolos de desensibilización como la inmunoterapia oral que han demostrado ser seguros y muy eficaces en el tratamiento de las alergias alimentarias, incluyendo la alergia al huevo [57]. Los protocolos de inducción de tolerancia oral específica o **SOTI** (del inglés *specific oral tolerance induction*) consisten en la administración por vía oral de cantidades crecientes del alérgeno alimentario para conseguir una tolerancia clínica al alérgeno que persiste incluso después de interrumpir la terapia. Aunque diversos estudios sugieren que una gran mayoría de niños con alergia alimentaria pueden ser desensibilizados con éxito mediante los protocolos SOTI, se desconocen cuales son los

mecanismos inmunológicos que hacen posible esta desensibilización o inducción de tolerancia. Varios estudios describen valores disminuidos de IgE específicas y un aumento en los niveles de IgG4 en niños tratados con SOTI [57, 58]. Sin embargo, se desconoce cual es el mecanismo responsable de estos cambios en la producción de anticuerpos implicados en el proceso alérgico. De hecho, no hay datos sobre qué poblaciones inmunitarias están detrás del proceso de inducción de tolerancia, ni existen marcadores que permitan predecir o identificar la tolerancia espontánea o inducida en pacientes alérgicos. El desarrollo y mejora de estas terapias requiere un mejor conocimiento de los mecanismos inmunológicos implicados en la inducción de tolerancia para hacerlas aun más eficaces y seguras.

Se ha propuesto que, además de la disminución o control de las células efectoras implicadas en los procesos alérgicos, la generación de células Treg constituiría uno de los principales mecanismos capaces de prevenir la reactividad inapropiada frente a antígenos inocuos. En modelos animales se ha demostrado que efectivamente las Treg son capaces de prevenir las respuestas alérgicas [59-61]. Sin embargo, se desconoce el papel de las Treg en los procesos alérgicos en humanos, y si las Treg están implicadas en la inducción de tolerancia que se consigue con los protocolos SOTI. Pensamos que los valores de Treg podrían guardar relación con la incidencia de estos procesos alérgicos durante la infancia y jugar un papel clave en la inducción de tolerancia.

1.3.4. Papel de las células Treg en la homeostasis inmune durante la infancia

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios aparecidos en los últimos años sobre las células Treg son numerosos [revisado en (4, 5, 8, 9)]. Se ha avanzado mucho en el conocimiento de las bases moleculares de la actividad de estas células gracias a numerosos estudios *in vitro* y en modelos animales (10, 15, 24). También se han realizado numerosos estudios en adultos analizando el papel de las Treg en distintas patologías relacionadas con el sistema inmune. Sin embargo, existen muy pocos datos sobre la presencia y el papel de estas células reguladoras en niños (28-30).

El sistema inmune del niño constituye el modelo perfecto para estudiar como la maduración y desarrollo de esta población de células influye en la homeostasis y equilibrio de las respuestas inmunes. Además, la función tímica preservada en niños nos permitirá estudiar cómo se genera y cómo se establece el repertorio de esta población. Por otro lado, se ha descrito recientemente que las Treg que presentan un fenotipo “virgen” (células T CD45RA⁺Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺) presentan una expresión más constante y mantienen la capacidad supresora más tiempo que las Treg CD45RA⁻ (62). Cabe esperar que las Treg CD45RA⁺ que provendrían directamente del timo serán mucho más abundantes en niños que en adultos, por lo que la eficacia de las respuestas supresoras de Treg puede ser más marcada en niños constituyendo un excelente modelo para el estudio de la función de Treg.

El objetivo de esta Tesis fue realizar un estudio piloto para estudiar en primer lugar el desarrollo de las Treg en el periodo fetal, para ello se analizaron los valores de Treg en muestras de cordón procedentes de neonatos a distintas semanas de gestación. Además, se realizó un análisis inmunológico exhaustivo en estas muestras con el fin de

establecer qué alteraciones inmunológicas podrían estar detrás de la alta incidencia de infecciones en neonatos prematuros. Otro de los objetivos fue analizar el papel de las células Treg en la homeostasis inmunológica y en determinadas patologías asociadas al sistema inmunitario. La hipótesis de trabajo fue que determinadas patologías que se dan en la infancia como alergias, enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias podrían deberse a una disfunción de las células Treg, bien como consecuencia de la inmadurez del sistema inmune en la infancia o por alteraciones en la generación del repertorio de Treg, o por una deficiencia en su producción tímica (como es el caso de niños con síndrome de DiGeorge). Además de determinar el papel de las Treg en niños y establecer las bases de posibles tratamientos o de la utilidad diagnóstica de estas células en pediatría, nuestros resultados podrían aportar información clave para el mejor entendimiento de los mecanismos de acción de estas células y de su papel en patologías de adultos.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

El **objetivo principal** de esta Tesis es determinar el papel que juegan las células T reguladoras [Treg] en la homeostasis inmune durante la infancia, y estudiar su implicación en distintas patologías o alteraciones asociadas al sistema inmunitario. Para llevar a cabo este objetivo se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- 1) Realizar un análisis comparativo entre neonatos prematuros y nacidos a término de las distintas poblaciones inmunes y determinar si existe alguna deficiencia inmunológica que pudiera estar implicada en la alta incidencia de infecciones en neonatos prematuros.
- 2) Determinar los valores de células Treg en neonatos a distintas semanas de gestación para estudiar el desarrollo fetal de esta población.
- 3) Realizar un análisis exhaustivo de las poblaciones inmunes, incluyendo la población Treg, en niños asintomáticos con síndrome de DiGeorge y determinar cómo afecta la disfunción tímica a la homeostasis inmune.
- 4) Estudiar los cambios que experimentan distintos parámetros inmunes en niños con alergia a huevo que han alcanzado la tolerancia tras seguir un protocolo de inmunoterapia oral. Determinar qué poblaciones inmunitarias pueden estar implicadas en la desensibilización o adquisición de tolerancia.

3. METODOLOGÍA

3. Metodología

El trabajo se realizó en el Laboratorio de InmunoBiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, y en el Biobanco VIH/HGM de muestras pediátricas VIH situado en el Hospital Materno Infantil Gregorio Marañón. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Se informó a todos los padres o tutores legales de los niños enrolados en los estudios, y se obtuvo un consentimiento informado en cada caso siguiendo las pautas de la Declaración de Helsinki. Los análisis de citometría se realizaron en la Plataforma de Citometría y Sorter del IISGM.

3.1. Poblaciones de estudio y unidades participantes

Las muestras de sangre se procesaron dentro de las primeras 6h tras su extracción en el Biobanco VIH/HGM [63], cumpliendo con los requisitos de bioseguridad. Tanto para el estudio en pacientes con Síndrome de DiGeorge como en el estudio con niños alérgicos no se extrajeron muestras cuyo único fin fueran los estudios de investigación. Con el fin de no perturbar en ninguna medida a los pacientes, se aprovechó sus visitas periódicas al centro y la extracción programada de sangre para análisis para extraer un tubo extra de sangre que se utilizaría con fines de investigación.

3.1.1. Estudio en muestras de cordón de neonatos

El estudio se realizó con la colaboración del Departamento de Neonatología y Ginecología (Dr. Angel Aguarón) y la Sección de Inmunopediatría (Dra. Dolores Gurbindo) del Hospital Materno Infantil Gregorio Marañón (Madrid). Se obtuvieron muestras de sangre de cordón de un total de 211 neonatos. El criterio de inclusión en el estudio fue madres sanas sin enfermedad destacable y neonatos que no presentaran alteraciones genéticas o defectos de relevancia al nacimiento. Se excluyeron del estudio los casos que presentaban diabetes, defectos cromosómicos o infecciones. La sangre se obtuvo por venopunción del cordón umbilical unido a la placenta inmediatamente después de separarlo del neonato y asegurándose de realizar la extracción en vasos con circulación fetal. La sangre se recogió en tubos con EDTA y se procesó inmediatamente tras su extracción. Todos los parámetros se midieron en fresco dentro de las 6h de extracción, ya que la congelación de células podría alterar la expresión de determinados marcadores. Los neonatos se dividieron en dos grupos atendiendo a su edad gestacional. El **grupo de neonatos prematuros** lo constituían 117 niños con una edad gestacional inferior a 37 semanas, y el **grupo de neonatos nacidos a término** estaba formado por 94 niños con edad gestacional superior a 37 semanas.

3.1.2. Estudio en niños con Síndrome de DiGeorge

Se realizó un análisis del sistema inmune de niños con el *Síndrome de la delección 22q11.2* (también conocido como Síndrome de DiGeorge) en colaboración con la Sección de Inmunopediatría (Dra.

Dolores Gurbindo) y la Sección de Cardiología Pediátrica (Dra. Manuela Camina, Dr. Enrique Maroto) del Hospital Materno Infantil Gregorio Marañón (Madrid). Se enrolaron 10 niños que, tras presentar alguna alteración cardíaca al nacimiento (interrupción aórtica, tetralogía de Fallot, atresia pulmonar, etc.) habían sido diagnosticados como Síndrome de DiGeorge al detectar la delección 22q11.2. La edad media (\pm E.E.M.) de los niños a la entrada del estudio fue de $3,39 \pm 0,81$ años. Todos los niños enrolados estaban clínicamente estables y se excluyeron del mismo los pacientes con historial de infecciones recurrentes o aquellos a los que se le había practicado una timectomía durante la cirugía cardíaca. En el estudio también se incluyó un grupo de 12 niños sanos como grupo control con una edad media (\pm E.E.M.) de $3,40 \pm 0,33$ años, comparable a la del grupo de pacientes DiGeorge.

3.1.3. Estudio en niños con alergia alimentaria

Se investigó qué mecanismos inmunológicos estaban implicados en la adquisición de tolerancia que se conseguía tras administrar una inmunoterapia oral a niños con alergia al huevo. El estudio se realizó en colaboración con la Sección de Alergia Pediátrica (Dres. Elena Alonso, Victoria Fuentes, Lidia Zapatero y Sonsoles Infante) del Hospital Materno Infantil Gregorio Marañón (Madrid). Se enrolaron 19 niños alérgicos al huevo con una edad media (\pm E.E.M.) de $9,23 \pm 0,68$ años y 22 niños sanos como grupo control con una edad media de $7,20 \pm 0,82$ años. Antes de ser incluidos en el protocolo de desensibilización, se realizó un test oral con huevo en aquellos niños alérgicos que no habían tenido ningún episodio clínico en los últimos 3 meses para confirmar que no se habían vuelto tolerantes de manera espontánea. También se realizaron test cutáneos y/o test de contacto labial antes y después del

protocolo. Los test cutáneos o “prick” se realizaron con huevo en polvo a varias diluciones (10, 5 y 1 mg/ml).

Protocolo de Desensibilización. Se realizó un protocolo de *inducción de tolerancia oral específico* o SOTI administrando huevo en polvo pasteurizado mezclado con zumo de frutas o batidos. La administración inicial se realizó en el hospital bajo control y supervisión médica, y si la dosis era tolerada se permitió a los pacientes continuar con la misma dosis en casa. El primer día se administraba una dosis fraccionada hasta alcanzar los 31 mg de huevo, empezando con 1 mg, después se continuaba con 3, 9 y 18 mg en intervalos de 30 min. El segundo día se administraba una única dosis de 30 mg, y se continuaba el tratamiento en casa con la misma dosis. A continuación el paciente era citado semanalmente al centro y se le aumentaba la dosis cada semana hasta alcanzar los 10 g de huevo en polvo que son equivalentes a un huevo entero. Cuando el paciente toleraba correctamente 10 g de huevo se consideraba desensibilizado y el protocolo se daba por concluido. Se recomendaba al paciente que hiciera una dieta normal y se realizaba un seguimiento a los 6 y 12 meses para confirmar la ausencia de respuestas alérgicas. Se obtuvieron muestras de sangre antes de iniciar SOTI (TO) y una vez que el paciente había alcanzado la tolerancia (Tend). Para cada paciente, se compararon las muestras obtenidas a TO y a Tend con el fin de establecer los cambios inmunológicos entre las dos muestras y que podrían estar implicados en la adquisición de tolerancia.

3.2. Procesamiento de las muestras de sangre

Las muestras de sangre recogidas en tubos con EDTA se procesaron dentro de las 6h desde su extracción. Se separaron muestras de plasma de cada muestra mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C para su posterior uso en el análisis de citoquinas en plasma. Parte de la sangre se utilizó para la determinación de las poblaciones inmunes mediante citometría de flujo directamente en sangre total.

Con el resto de la sangre se realizó una separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). La sangre se diluyó 1:1 en tampón fosfato salino estéril (150 mMClNa, pH 7.2) (PBS) (Lonza, BioWhittaker). Posteriormente, esta sangre diluida, se centrifugó en gradiente de densidad Ficoll Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) a 1800 rpm durante 30 minutos, recogiendo la fase que contenía las PBMCs. Se realizaron 2 lavados de las PBMCs con PBS a 1500 rpm durante 10 minutos, tras los cuales se hizo un recuento para determinar la cantidad de PBMCs presentes en la muestra. Se guardaron pellets secos de 1 millón de PBMCs a -80°C para su posterior uso en la obtención de ácidos nucleicos (ADN y/o ARN). Con las PBMCs sobrantes se procedió inmediatamente con el análisis de células Treg en células permeabilizadas mediante citometría de flujo.

3.3. Análisis de poblaciones inmunes mediante citometría de flujo

Los linfocitos (así como otros leucocitos) expresan un gran número de moléculas de superficie diferentes, que se pueden utilizar para distinguir (o “marcar”) las distintas poblaciones celulares. En la actualidad, muchos de estos marcadores celulares pueden ser detectados mediante anticuerpos monoclonales específicos. Se ha desarrollado un método sistemático de nomenclatura, denominado sistema CD, en el que el término CD (del inglés *cluster designation*) designa grupos (clusters) de anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une específicamente a un marcador celular.

El porcentaje y número absoluto de las distintas poblaciones inmunitarias se determinó a partir de muestras de sangre total. Se añadieron 50 µl de sangre total por cada tubo de citometría, se le añadieron los distintos anticuerpos monoclonales correspondientes a cada panel (Tabla 1) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. El tubo con la sangre y anticuerpos se procesó directamente en un sistema *Coulter TQ-Prep* (Beckman Coulter, Marsella, Francia) que de forma automatizada realiza la lisis de eritrocitos. A continuación se añadieron 50 µl de *Flow-count Fluorospheres* (Beckman Coulter) para poder determinar el número absoluto de células de las distintas poblaciones inmunes. Inmediatamente se adquirió la muestra en un citómetro *FC-500* o *Gallios* (Beckman Coulter), adquiriendo un mínimo de 80000 eventos en cada tubo. Todos los anticuerpos utilizados provenían de Beckman Coulter y se usaron siguiendo las instrucciones y cantidades recomendadas por el fabricante. El análisis de los datos se realizó mediante el software *CXP* o *Kaluza* (ambos de Beckman Coulter). En la Tabla 1 se recogen los marcadores de superficie utilizados para identificar cada una de las subpoblaciones. Antes de

cada adquisición se realizó una compensación de los distintos detectores del citómetro y se adquirieron los correspondientes controles isotípicos.

Población	Marcadores
Monocitos	CD45 ⁺⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁺
Basófilos	SS ^{low} CD45 ^{low} CD3 ⁻ CD14 ⁻
Granulocitos	SS ^{high} CD45 ⁺
▪ Neutrófilos	SS ^{high} CD45 ⁺ CD16 ⁺
▪ Eosinófilos	SS ^{high} CD45 ⁺ CD16 ⁻
Linfocitos totales	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD14 ⁻
▪ Células NK	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD14 ⁻ CD3 ⁻ CD16 ⁺
▪ Células NKT	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD14 ⁻ CD3 ⁺ CD56 ⁺
▪ Linfocitos B	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD14 ⁻ CD3 ⁻ CD19 ⁺
▪ Linfocitos T	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺
– Linf. T CD127 ⁺	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD127 ⁺
– TCD4⁺	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
• Naive	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁺ CD45RA ⁺
• Memoria	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺
• Activadas	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺
• Memoria Efectoras	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD45RA ⁺
• RTEs	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺
• TCD4 ⁺ CD127 ⁺	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ⁺
– TCD8⁺	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺

• Naive	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁺ CD45RA ⁺
• Memoria	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺
• Activadas	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺
• Memoria Efectoras	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD27 ⁻ CD45RA ⁺
• RTEs	SS ^{low} CD45 ⁺⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺

Tabla 1. Marcadores de superficie utilizados para identificar las distintas poblaciones inmunes. –: no expresión; low: expresión baja; +: expresión; ++: expresión alta.

3.4. Análisis de células Treg

El análisis de células Treg se realizó bien en sangre total, identificándolas como células $CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ tal y como describen *Liu et al.* [64] (Figura 13), o a partir de PBMCs realizando un marcaje intracelular de Foxp3 ($CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$) [9] (Figura 14). Se confirmó en un grupo de 10 muestras de cordón que la población Treg identificada mediante los marcadores de superficie ($CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$) coincidía en más de un 93% con la población Foxp3+, que es el marcador que en la actualidad se considera como el marcador que define a esta población.

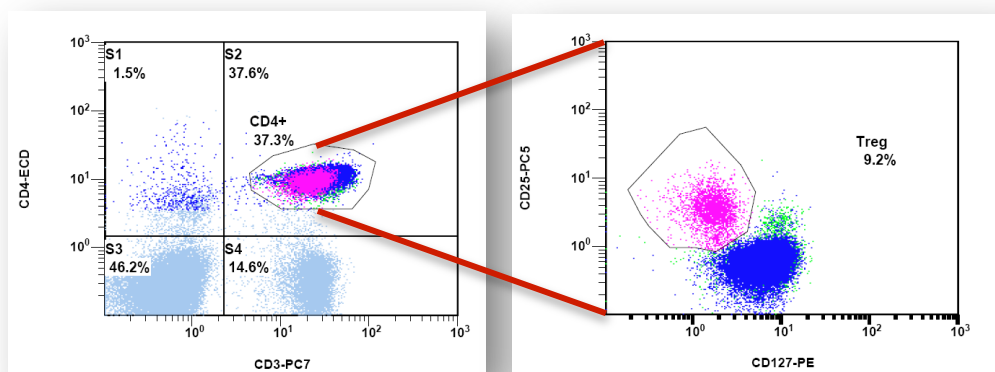


Figura 13. Células Treg identificadas mediante marcadores de superficie ($CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$).

El marcaje de Foxp3 se realizó a partir de PBMCs aisladas como se describe en el apartado 3.2. Las células se dispensan en un tubo y se añaden anticuerpos frente a los marcadores de superficie. Se incubaron las células durante 20 minutos a 4°C y se procedió a la

permeabilización de las membranas mediante el kit *Human Regulatory T cell Staining Kit* (eBiosciences, San Diego, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió un anticuerpo anti-Foxp3 (eBiosciences) para el marcaje intracelular de la molécula y se procedió a la adquisición en un citómetro *FC-500* o *Gallios* (Beckman Coulter). Se adquirieron un mínimo de 80000 eventos y el análisis se realizó mediante el software *Kaluza* (Beckman Coulter).

Se seleccionaron los linfocitos TCD4⁺ y en esta población se definieron las Treg mediante el marcaje CD25⁺Foxp3⁺ [Figura 14]. El fenotipo de las células Treg se estableció añadiendo como marcador de superficie un anticuerpo anti-CD45RA que permitía definir la población de células Treg naïve (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD45RA⁺) y de células Treg efectoras (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD45RA⁻).

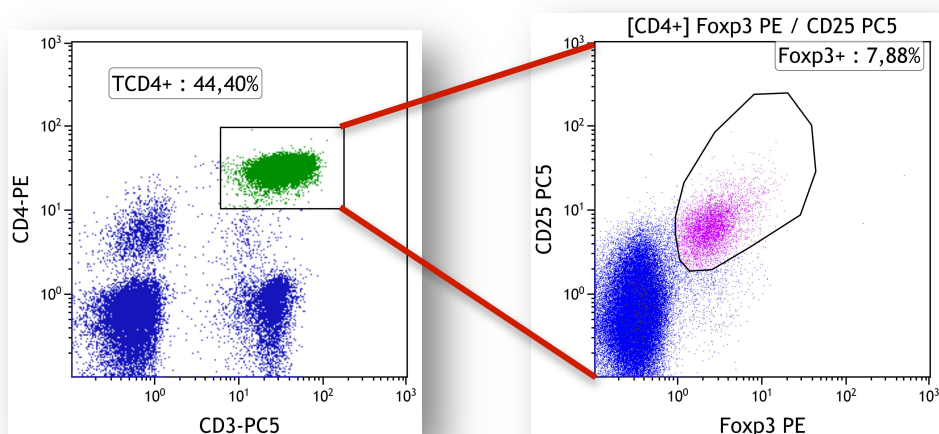


Figura 14. Células Treg identificadas mediante marcaje intracelular de Foxp3 (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺).

3.5. Análisis de función tímica (cuantificación de TRECs)

La función tímica o producción por parte del timo de nuevas células T se estudió midiendo por *PCR cuantitativa en tiempo real* la cantidad de “*T-cell rearrangement excision circles*” (TRECs) en PBMCs totales o en linfocitos TCD4+ y TCD8+. Los TRECs son unos elementos de ADN circular que se forman durante el procesamiento de los genes que dan lugar al receptor de la célula T (TCR) [35]. Estos TRECs no se replican durante la división celular por lo tanto sólo aparecen en las células naïve que acaban de salir del timo y se van diluyendo a medida que estas células sufren sucesivas divisiones. Dentro de estos TRECs se han descrito dos tipos: los “*signal-joint*” (sjTREC) y los β -TREC. Se ha descrito que el ratio entre estos elementos constituye una medida precisa de la función o “*output*” tímico [65]. Se usaron PBMCs totales o células TCD4+ o TCD8+ purificadas mediante kit específicos de separación inmunomagnética (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de pellet congelados de estas células se extrajo el ADN usando el kit *QIAMP-DNA* (Qiagen). La PCR cuantitativa se realizó usando el equipo *Lightcycler* y el kit *LightCycler FastStart DNA MasterPLUS* (ambos de Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), tal y como se describe en el trabajo de *Ferrando et al.* [65]. Brevemente, se amplificaron los 6 D β J β -TRECs (β -TRECs) del “*cluster*” 1 en el mismo tubo de PCR y los sj-TRECs en otro tubo distinto. Se realizaron 25 ciclos de amplificación para los β -TRECs y 21 ciclos para los sj-TRECs para garantizar una cuantificación precisa. Ambos amplicones β - y sj-TRECs se reamplificaron juntos mediante PCR cuantitativa. Se utilizaron sondas específicas FRET [*Förster Resonance Energy Transfer*] tal y como se describen en [65].

También se utilizó como marcador de función tímica la cuantificación de la molécula *proteína tirosina kinasa 7* (PTK7) en linfocitos T [66] usando un anticuerpo anti-hPTK7-PE (Miltenyi Biotec). La presencia de CD31 en células T naive se considera que es un marcador de células que han salido recientemente del timo (RTEs) [67, 68]. Por tanto también utilizamos la frecuencia de RTEs como un marcador indirecto de producción tímica.

3.6. Cuantificación en plasma de citoquinas e inmunoglobulinas

Mediante centrifugación se separaron muestras de plasma de cada uno de los pacientes o cordones y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La concentración en plasma de interleuquina 7 (IL-7) se determinó usando un kit comercial de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) *Quantikine HS Human IL-7* (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite mínimo de detección con este kit es de 0,1 pg/ml. La determinación en plasma de diversas citoquinas en las muestras del estudio en niños alérgicos se realizó mediante el kit comercial Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex kit (eBiosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los valores de IgE totales y específicos para clara, yema de huevo, ovoalbúmina (OVA) y ovomucoide (OVM), así como los valores de IgG específica frente a clara de huevo fueron medidos usando un kit comercial *CAP* (CAP-Phadia, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software comercial *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 17.0, Chicago, Illinois, EEUU). El test de *T-student* se utilizó para comparar medias entre grupos cuando las variables seguían una distribución normal. Para las variables que no tenían una distribución normal o cuando la “n” era inferior a 15 se utilizó el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. Para el estudio en pacientes alérgicos se utilizó el test de *Wilcoxon* para muestras pareadas para comparar los valores a [TO] y a [Tend] del mismo paciente. La correlación entre variables se estableció mediante el test de correlación de *Pearson*. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Para evaluar el papel que juegan las células Treg en la homeostasis inmune durante la infancia se estudió en primer lugar si esta población está presente desde el nacimiento, o por el contrario, las Treg se producen de forma tardía durante el proceso de maduración del sistema inmune. Para ello, se hizo un estudio sobre el ***desarrollo de las poblaciones inmunes en el recién nacido***, haciendo especial hincapié en los valores de Treg. A continuación, se investigó qué efecto podría tener una deficiencia de células Treg y si esta deficiencia podría relacionarse con determinadas alteraciones inmunes durante la infancia. Este estudio se realizó en ***pacientes con síndrome de DiGeorge***, que al presentar una disfunción tímica podrían constituir un modelo de pacientes con una deficiencia congénita de células Treg. Por último, se investigó cómo las Treg pueden participar en la homeostasis inmunológica y cómo su papel supresor puede permitir controlar las respuestas inadecuadas del sistema inmune. Para ello, se analizaron los ***cambios inmunológicos que conducen a la desaparición de respuestas alérgicas*** en niños tratados con inmunoterapia oral, estudiando el papel que juegan las Treg en la adquisición de tolerancia.

4.1. Estudio del Desarrollo del Sistema Inmune en el Recién Nacido

Para analizar como se genera la población de células Treg y determinar si existen valores adecuados de esta población desde el nacimiento, se determinaron los valores de Treg en muestras de cordón umbilical de neonatos nacidos a distintas semanas de gestación. De esta manera, podemos determinar en qué momento de la gestación se generan las Treg, y también establecer qué valores tienen tanto los neonatos nacidos prematuramente como los nacidos a término.

Además, a partir de estas muestras de cordón también se realizó un análisis exhaustivo de las distintas poblaciones inmunes para así establecer como se correlacionan los valores de Treg con los de otras poblaciones inmunes, y qué diferencias existen entre neonatos prematuros y los nacidos a término. El riesgo relativo de muerte perinatal en neonatos prematuros es mucho mayor que en los nacidos a término, siendo la prematuridad la principal causa de morbilidad y mortalidad perinatal [39, 40]. La displasia broncopulmonar y la sepsis neonatal son las principales causas de la mayor mortalidad en prematuros [40]. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la inmunidad innata en prematuros y la capacidad de su sistema inmune de combatir las infecciones. El exhaustivo análisis inmunológico realizado nos permitió además establecer si la mayor incidencia de infecciones se debe a que los neonatos prematuros presentan deficiencias en alguna población inmunitaria.

Se analizaron los porcentajes y valores absolutos de las distintas poblaciones inmunes en sangre de cordón de un total de 211 neonatos. Las muestras fueron distribuidas en 2 grupos atendiendo a su edad gestacional y se estudiaron las diferencias entre estos grupos. El **grupo de neonatos prematuros** agrupó a 117 niños con una edad gestacional

inferior a 37 semanas, y el **grupo de neonatos nacidos a término** estuvo constituido por 94 niños con edad gestacional superior a 37 semanas.

4.1.1. Valores Clínicos de Neonatos

Se recogieron las características físicas así como los valores de pH de cada neonato, y la edad materna en el momento del parto. Dado que el objetivo principal del estudio es el análisis de poblaciones inmunes, no se consideraron otros parámetros en el neonato como el sufrimiento fetal, uso de cesárea, apgar, etc. La mediana (percentil 25-75) de edad gestacional fue de 33 (31-35) semanas para el grupo de prematuros y de 39,6 (38-41) semanas para el grupo de los nacidos a término. Observamos que entre los niños prematuros había un alto porcentaje de varones y que su frecuencia fue significativamente mayor que en el grupo de nacidos a término ([Tabla 2](#)). Los resultados revelan que los niños prematuros mostraron un peso significativamente menor ($p < 0.001$) y una talla también inferior ($p = 0,044$) a la de niños nacidos a término ([Tabla 2](#)), y se observó una correlación directa entre la edad gestacional y el peso o la talla del neonato ($p < 0.001$).

Parámetros clínicos	N	Prematuros	N	Término	Valor <i>P</i>
Semanas	117	33 [31-35]	94	39,6 [38-40,9]	0,000
Peso (gr)	110	2050 [1539-2540]	91	3300 [3070-3570]	0,000
Talla (cm)	16	47,7 [44,2-49]	19	49,5 [48-51]	0,044
Sexo (nº varones, %)	117	78 (67%)	94	40 (42%)	0,000
pH arterial	107	7,34 [7,29-7,38]	81	7,28 [7,22-7,33]	0,000
Edad Materna	108	31 [26,3-35]	85	31 [28-35]	N. S.

Tabla 2. Parámetros clínicos de neonatos prematuros y nacidos a término obtenidos en el momento del parto. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$)

Los valores de pH arterial fueron más elevados en el grupo de niños prematuros (Tabla 2). Sin embargo, en la gran mayoría de la muestras (97%) los valores de pH arterial fueron superiores a 7,15 que ha sido definido como el valor límite indicativo de acidosis (69). Por tanto, dado que la práctica totalidad de neonatos en ambos grupos estaban por encima de este valor, podemos concluir que, aunque el valor de pH fue superior en prematuros, la incidencia de acidosis fue comparable en ambos grupos. No se observó ninguna diferencia en cuanto a la edad materna en los dos grupos de neonatos (Tabla 2), por lo que en la cohorte de neonatos no se observó una relación entre la prematuridad y una mayor edad materna.

4.1.2. Los Neonatos Prematuros presentan una Marcada Leucopenia

Se realizó un análisis exhaustivo mediante citometría de flujo de las distintas poblaciones de células inmunitarias, para determinar si existen diferencias entre neonatos prematuros y nacidos a término, tanto cualitativas [proporción o porcentaje] como cuantitativas [número absoluto de células por μl de sangre].

4.1.2.1 Proporción de poblaciones de leucocitos

Los resultados muestran que los niños prematuros tenían un mayor porcentaje de linfocitos totales que los nacidos a término [Figura 15]. No se observaron diferencias significativas entre grupos en cuanto al porcentaje de monocitos ni de basófilos. El porcentaje de granulocitos totales fue inferior en el grupo de prematuros, los cuales, presentaron menor porcentaje de neutrófilos y mayor porcentaje de eosinófilos [Tabla 3].

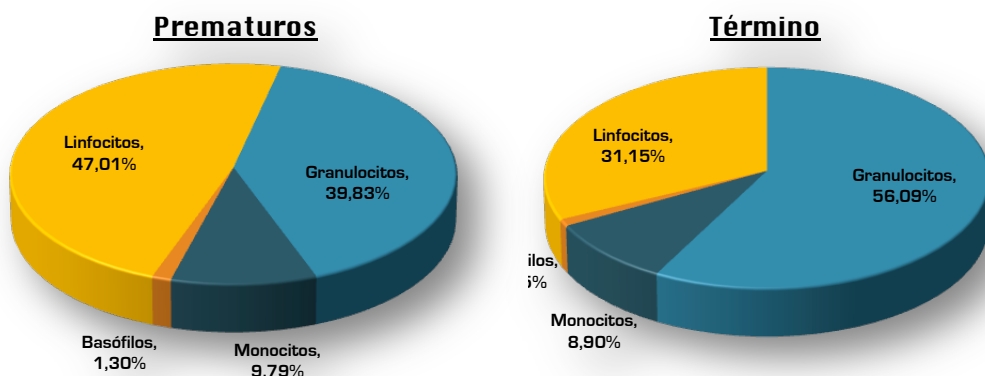


Figura 15. Valor medio de los porcentajes de las distintas poblaciones de leucocitos en sangre de cordón de neonatos prematuros y nacidos a término.

	N	Prematuros	N	Término	Valor <i>p</i>
% Linfocitos #	21	45,93 [36,3-59,4]	17	31,09 [27-35,3]	0,000
% Monocitos #	23	9,73 [7,2-11,1]	18	8,69 [7,48-10,11]	N. S.
% Basófilos #	23	1,14 [0,89-1,44]	18	0,84 [0,61-1]	N. S.
% Granulocitos #	23	40,03 [26,1-51,5]	18	56,49 [53,03-59,9]	0,000
% Neutrófilos §	23	84,12 [73,3-87,2]	18	89,42 [84,2-92,8]	0,002
% Eosinófilos §	23	9,66 [5,19-13,53]	18	4,04 [2,85-6,67]	0,020

Tabla 3. Porcentajes de las distintas poblaciones de leucocitos en sangre de cordón. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). # Porcentaje con respecto al total de leucocitos. § Porcentaje con respecto al total de granulocitos. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

4.1.2.2 Número absoluto de poblaciones de leucocitos

Se determinó el número total de células por μl de sangre que a diferencia del porcentaje, que es una medida relativa, nos indica la cantidad real de células en circulación. Esta medida es independiente del volumen sanguíneo y del peso del neonato, ya que por un lado la muestra se obtiene del cordón y no de circulación periférica, y por otro lado al calcularse el valor por cada μl de sangre nos está indicando la concentración de cada tipo celular independientemente del volumen sanguíneo total.

A diferencia de los resultados obtenidos en cuanto a porcentaje, observamos que todas y cada una de las poblaciones de leucocitos están muy disminuidas en prematuros [Figura 16]. El número absoluto de linfocitos, monocitos y granulocitos fue significativamente inferior ($p < 0.001$) en prematuros que en neonatos nacidos a término [Tabla 4]. Analizando los valores de los distintos tipos de granulocitos observamos que el número de basófilos, eosinófilos, y sobre todo de neutrófilos (que fue 3,8 veces inferior) estaban disminuidos en prematuros [Tabla 4].

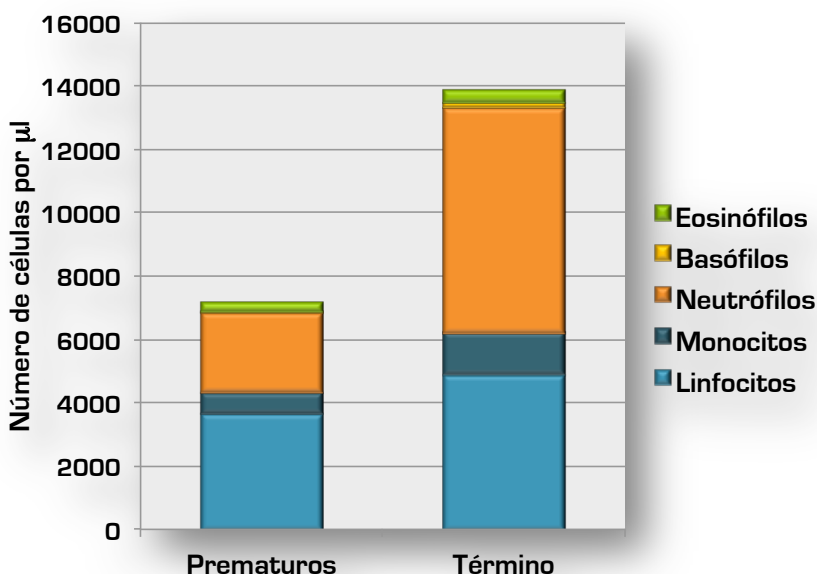


Figura 16. Valores medios del número de células por μl de sangre para las distintas poblaciones de leucocitos.

	N	Prematuros	N	Término	Valor <i>p</i>
Linfocitos	103	3372 (2274-4516)	85	4378 (3507-5957)	0.000
Monocitos	23	601 (440-804)	17	1241 (975-1504)	0.000
Granulocitos	23	2252 (1222-3959)	17	7930 (6491-10142)	0.000
Basófilos	23	61 (48-106)	17	130 (88-159)	0.047
Neutrófilos	23	1780 (753-3125)	17	6781 (5498-8991)	0.000
Eosinófilos	23	171 (122-426)	17	346 (223-559)	0.037

Tabla 4. Valores absolutos (células por μl) en sangre de cordón de poblaciones inmunes. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

4.1.2.3 Proporción de subpoblaciones de linfocitos

Dentro de los linfocitos totales se determinaron las proporciones de células *natural killer* (NK), linfocitos B y linfocitos TCD4+ y TCD8+. El porcentaje de células NK y de linfocitos B fue significativamente inferior en neonatos prematuros, mientras que el porcentaje de linfocitos T (tanto CD4+ como CD8+) fue superior en prematuros que en los nacidos a término [Tabla 5, Figura 17]. Como se ha mencionado, hay que tener en cuenta que el porcentaje de un tipo celular dentro de una población es una medida relativa. Por lo tanto, un mayor porcentaje de linfocitos T puede significar que haya una mayor cantidad de estas células, pero también puede deberse a una caída de otros tipos celulares (como células B o NK) que haría que su proporción aumentase sin se produzca un aumento en su número.

	N	Prematuros	N	Término	Valor <i>P</i>
% Linfocitos					
% TCD4+ #	103	47,8 [42,4-54,5]	83	44,38 [38-51,1]	0,011
% TCD8+ #	103	17,96 [14,5-22,2]	83	16,15 [13,6-19,6]	0,048
% Linfocitos B #	103	15,84 [11,9-20,8]	83	17,91 [14,1-23,07]	0,029
% Células NK #	105	7,09 [3,8-11,8]	84	10,62 [4,98-18,4]	0,004

Tabla 5. Porcentajes de las distintas poblaciones de linfocitos en sangre de cordón. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). # Porcentaje con respecto al total de linfocitos. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

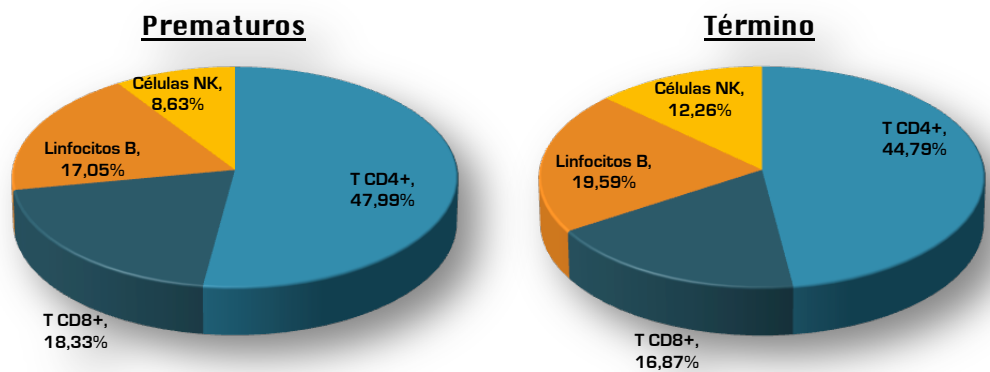


Figura 17. Distribución de las poblaciones de linfocitos en sangre de cordón. Se indican los valores medios de porcentaje de cada población con respecto al total de linfocitos.

4.1.2.4 Número absoluto de subpoblaciones de linfocitos

Dado que el número absoluto de linfocitos presentaron valores significativamente inferiores en neonatos prematuros se determinaron los recuentos de las distintas subpoblaciones para identificar qué tipo de linfocito estaba disminuido en este grupo. Los resultados muestran que todas y cada una de las poblaciones de linfocitos analizadas mostraron valores absolutos inferiores en prematuros que en los neonatos nacidos a término ($p < 0.01$) (Tabla 6, Figura 18).

	N	Prematuros	N	Término	Valor <i>P</i>
Linfocitos					
TCD4+	102	1605 (1140-2248)	81	1942 (1396-2458)	0.005
TCD8+	102	584 (383-794)	81	739 (533-931)	0.002
Células NK	103	222 (131.7-421)	78	469 (206-861)	0.000
Linfocitos B	101	518 (348-804)	77	746 (554-1056)	0.000

Tabla 6. Valores absolutos (células por μ l) en sangre de cordón de poblaciones de linfocitos. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

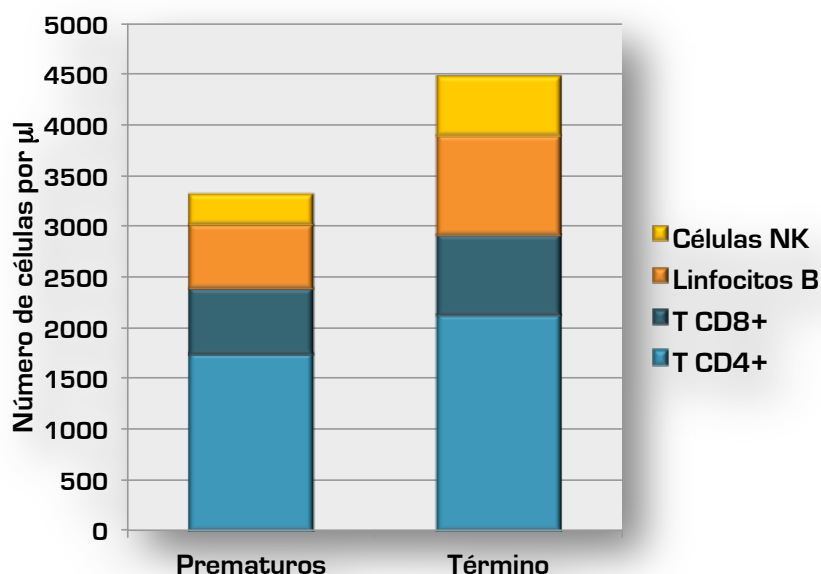


Figura 18. Valores medios del número de células por μl de sangre para las distintas poblaciones de linfocitos.

4.1.2.5 Proporción de subpoblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+

Las células T son una población de células que juegan un papel clave en la defensa frente a patógenos, pero además, son primordiales regulando prácticamente todas las respuestas inmunológicas y en la homeostasis del sistema inmune. Las células T se dividen principalmente en células T citotóxicas, caracterizadas por la expresión del marcador CD8, y células T colaboradoras (más conocidas como “helper”), caracterizadas por la expresión del marcador CD4. Dependiendo de su estado de activación y/o diferenciación tanto las células TCD4+ como las TCD8+ pueden presentar distintos fenotipos (naive, activadas, efectoras, memoria, etc). Dado que los resultados mostraron que los neonatos prematuros presentaban recuentos de células TCD4+ y TCD8+ muy inferiores a

los nacidos a término, decidimos analizar su fenotipo para determinar si la deficiencia de linfocitos T se debía a alguna subpoblación en concreto.

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los 2 grupos en cuanto a la proporción de las distintas subpoblaciones de linfocitos TCD4+ o TCD8+ (Tabla 7). Además se analizó la frecuencia de emigrantes recientes del timo (RTEs), definidas mediante el marcador CD31, y que constituyen un marcador indirecto de la producción tímica de nuevos linfocitos T [68]. Los resultados muestran que no hay diferencias de porcentaje de RTEs entre prematuros y nacidos a término. Por tanto, el menor número de linfocitos T en prematuros no parece ser debido a una menor producción tímica de linfocitos T.

Como se observa en la Tabla 7, más del 85% de las células TCD4+ y TCD8+ presentan un fenotipo naive, y una alta proporción de estas naive han salido recientemente del timo (RTEs). Esto se debería por un lado a la alta producción tímica de células T en neonatos, y por otro lado a que todavía no se han expuesto a ningún patógeno que induzca la diferenciación o activación de las células T.

	N	Prematuros	N	Término	Valor <i>P</i>
% Linfocitos TCD4+					
% Naive •	80	92,3 [71,4-95,6]	77	90,1 [70,3-95,9]	N.S.
% Memoria •	78	2,77 [1,6-4,6]	77	3,03 [1,8-4,79]	N.S.
% Activadas •	15	0,99 [0,7-2,4]	16	1,48 [0,98-1,92]	N.S.
% Efectoras •	80	0,10 [0,03-0,2]	77	0,05 [0,02-0,17]	N.S.
% RTEs •	23	51,7 [46,5-60,6]	17	64,79 [49,1-69,7]	N.S.
% Linfocitos TCD8+					
% Naive #	78	88,5 [81,4-93]	77	89,43 [85,6-93,2]	N.S.
% Memoria #	78	1,85 [0,35-4,68]	77	2,32 [0,63-4,2]	N.S.
% Activadas #	15	0,31 [0,23-0,39]	16	0,26 [0,21-0,38]	N.S.
% Efectoras #	78	1,06 [0,29-3,12]	77	0,89 [0,24-2,77]	N.S.
% RTEs #	23	77,06 [70,8-84,8]	17	80,31 [76,1-84,2]	N.S.

Tabla 7. Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T en sangre de cordón. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). • Porcentaje con respecto al total de linfocitos T CD4+. # Porcentaje con respecto al total de linfocitos T CD8+. N. S.: no significativo ($p>0,05$).

4.1.3. La proporción de células Treg está aumentada en Neonatos Prematuros

Las células Treg son una subpoblación de células TCD4+ con función supresora. Estas células pueden inhibir la proliferación y/o activación de otras células inmunes, constituyendo un elemento clave en la homeostasis inmunológica [5]. Se analizaron el porcentaje y valores absolutos de Treg, definidas como CD3+CD4+CD25+CD127–.

4.1.3.1 Frecuencia y valores absolutos de células Treg

Como hemos mencionado en el apartado anterior, dentro de la población de linfocitos T no existían diferencias entre los 2 grupos de neonatos en la proporción de ninguna de las subpoblaciones (naive, efectoras, memoria, etc). Sin embargo, los resultados mostraron que el porcentaje de Treg era significativamente mayor en el grupo de prematuros ($p = 0,001$) [Figura 19].

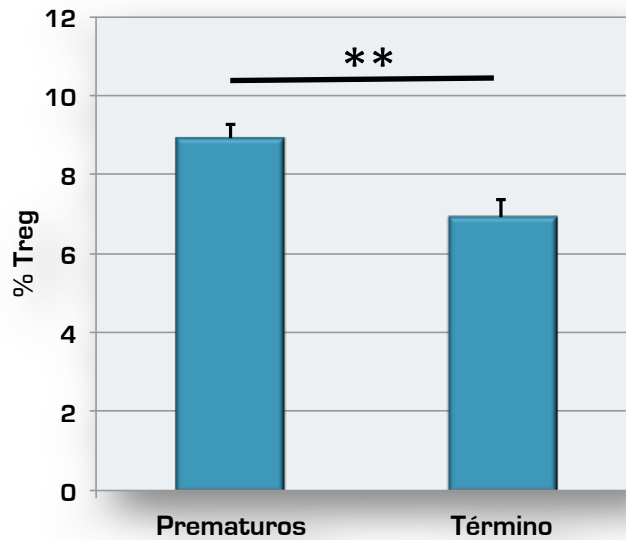


Figura 19. Valor medio (+E.E.M) del porcentaje de células Treg en el total de linfocitos TCD4+. **: $p < 0,01$

Además del porcentaje también se determinó el número absoluto de Treg. Como se ha comentado en apartados anteriores, todas y cada una de las poblaciones inmunes analizadas presentaban un valor absoluto inferior en el grupo de prematuros. Sin embargo, las células Treg constituyeron la única población inmune con valores absolutos en prematuros comparables a los presentes en neonatos nacidos a término ($p = 0,860$) (Figura 20).

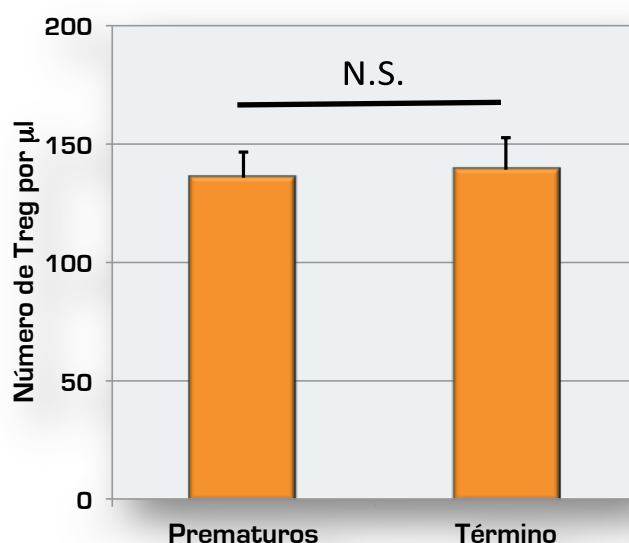


Figura 20. Valor medio (+E.E.M) del porcentaje de células Treg en el total de linfocitos TCD4+. N.S.: No significativo ($p > 0,05$)

Al analizar la evolución de los valores de Treg según la edad gestacional observamos que existe una correlación inversa entre la frecuencia de células Treg y la semana gestacional ($r = -0,666$; $p < 0,001$). Es decir, cuanto más prematuro es el neonato mayor porcentaje de Treg presenta y estos valores van disminuyendo a medida que avanza la edad gestacional (Figura 21).

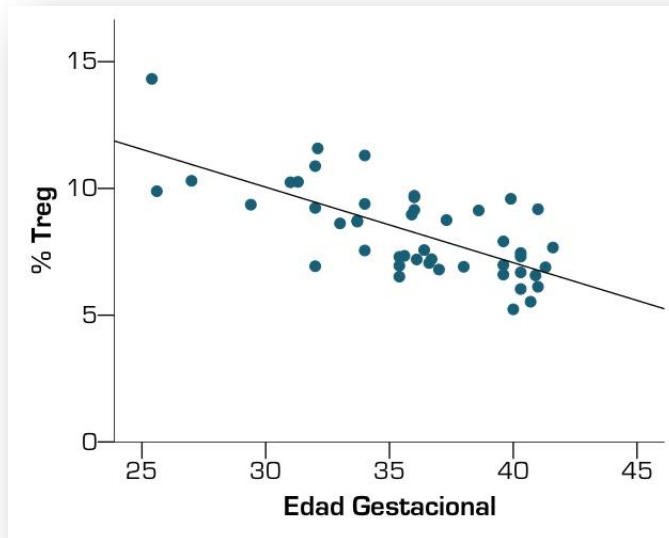


Figura 21. Correlación entre el porcentaje de células Treg y la edad gestacional en el total de neonatos (prematurados y nacidos a término).

4.1.3.2 Fenotipo de las células Treg

Se determinó qué fenotipo presentaban estas células Treg, distinguiendo entre Treg naïve [definidas como CD45RA+] o Treg efectoras [definidas como CD45RA–] (70). Los resultados mostraron que la proporción de Treg efectoras fue mayor en prematuros que en nacidos a término ($p = 0,048$) (Figura 22). Aunque no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto al número absoluto de Treg naïve o efectoras ($p > 0,05$), los resultados muestran que la cantidad de Treg efectoras en el grupo de prematuros fue ligeramente superior a la observada en nacidos a término (Figura 23).

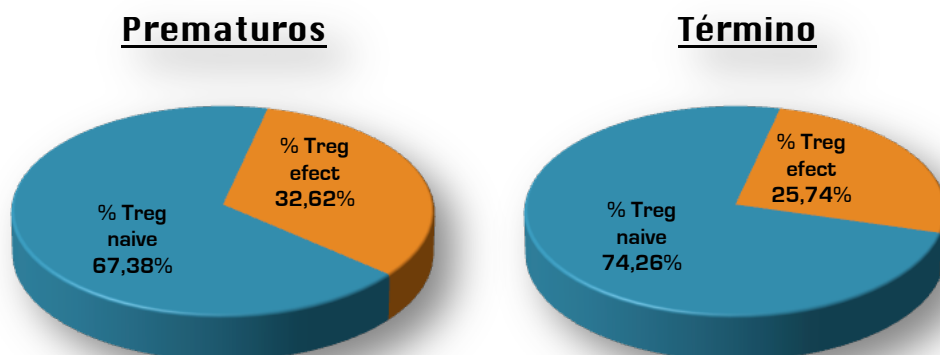


Figura 22. Fenotipo de células Treg en neonatos. Se indican los valores de porcentaje de Treg efectoras y Treg naive con respecto al total de Treg.

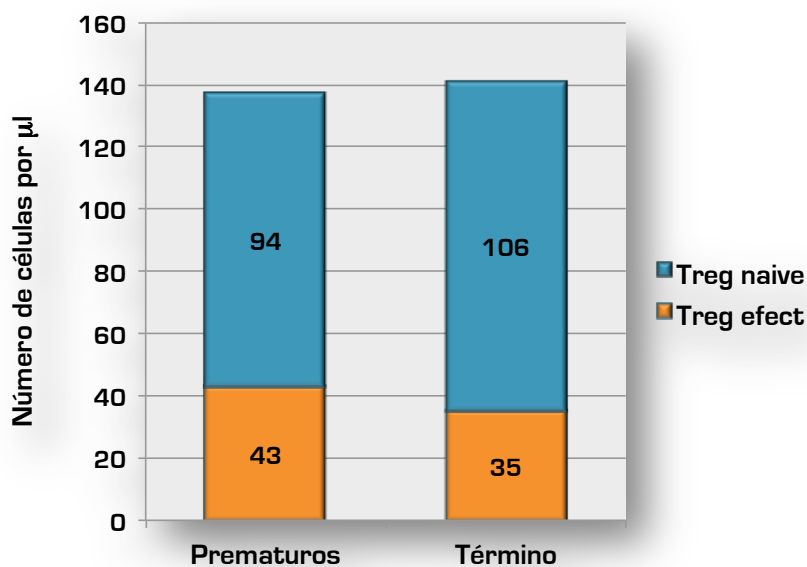


Figura 23. Número de células por μ l de sangre para las poblaciones de Treg naive y Treg efectoras.

4.1.4. Mecanismos implicados en la producción y supervivencia de linfocitos T

Dado el papel clave que juegan los linfocitos T, y en especial las Treg, en la homeostasis inmune decidimos profundizar más en las razones que podrían estar detrás de la marcada linfopenia observada en prematuros, y también explicar por qué a diferencia del resto de poblaciones de linfocitos, la frecuencia de Treg fue superior en prematuros que en neonatos nacidos a término.

4.1.4.1 Análisis de la Función Tímica

Uno de los posibles mecanismos que explicaría los recuentos inferiores de linfocitos T sería que la producción tímica de nuevas células T fuera inferior en los niños prematuros. Para analizar la función tímica se utilizó un método que cuantifica un marcador denominado “*T-cell rearrangement excision circles*” (TREC) en sangre periférica [35, 65]. Este marcador aparece en las células T recién salidas del timo y dado que no se replica durante la división su cantidad se considera directamente proporcional a la producción tímica de nuevos linfocitos T.

En colaboración con los Dres. Sara Ferrando y Manuel Leal del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, se determinó el ratio entre signal-joint TREC (sj-TREC) y β -TREC como se describe en el trabajo de Ferrando *et al.* [65]. No se encontraron diferencias significativas en el ratio TREC entre prematuros y neonatos nacidos a término, tanto en PBMCs totales ($p = 0,502$), como cuando se determinó en linfocitos T CD4+ purificados ($p = 0,707$) [Figura 24]. Además no se observó correlación entre los valores de TREC y los recuentos de linfocitos T ($p > 0,05$), por lo que no encontramos evidencias de que la deficiencia de

linfocitos T esté asociada a una menor producción tímica de estas células. También se midió la presencia de la proteína tirosina-kinasa 7 (PTK7), que se ha descrito que podría constituir también un marcador de función tímica [66]. La expresión de PTK7 fue indetectable en la población de linfocitos TCD8+ y en cuanto a los TCD4+ no se observaron diferencias significativas entre neonatos prematuros y los nacidos a término ($p = 0,077$). Además, como se mencionó en el apartado 4.1.2.5 no se observaron diferencias entre prematuros y nacidos a término en la frecuencia de células RTEs (Tabla 7) que constituyen un marcador indirecto de producción tímica, apoyando la ausencia de diferencias en cuanto a función tímica entre los dos grupos de neonatos.

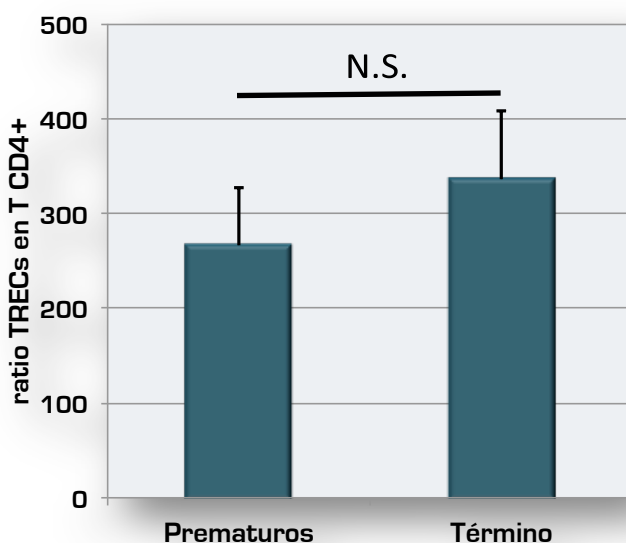


Figura 24. Valor medio (+E.E.M) del ratio sj-TREC/ β -TREC en linfocitos TCD4+. N.S.: No significativo ($p > 0,05$)

4.1.4.2 Valores plasmáticos de Interleuquina-7 (IL-7)

La IL-7 juega un papel determinante en la expansión y en la supervivencia de los linfocitos T en periferia [71, 72]. Dado que no encontramos evidencias en neonatos prematuros de una menor producción tímica, decidimos estudiar si la linfopenia observada podría deberse a alteraciones en los mecanismos responsables de mantener la expansión o supervivencia de las células T producidas. En primer lugar cuantificamos la concentración plasmática de IL-7 (Tabla 8), observando que en los neonatos prematuros los valores eran muy inferiores a los observados en los nacidos a término ($p = 0.001$) [Figura 25].

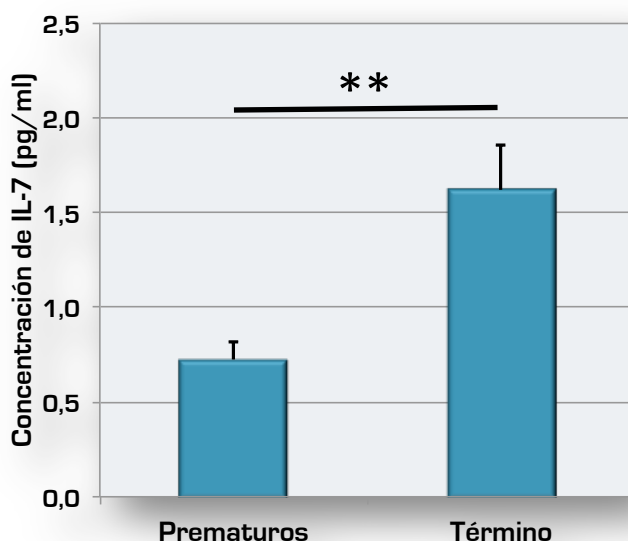


Figura 25. Valor medio (+E.E.M) de la concentración de IL-7 en plasma (pg/ml). **: $p < 0,01$.

También se determinó la presencia del receptor para la IL-7 (IL-7R α ó CD127) en linfocitos T totales y en células TCD4+. Los

resultados muestran que el porcentaje de linfocitos T y de TCD4+ que expresan dicho receptor IL-7R α fue significativamente inferior en neonatos prematuros [Tabla 8].

	N	Prematuros	N	Término	Valor <i>P</i>
IL-7 (pg/ml)	85	0,50 [0,2-0,8]	68	0,95 [0,32-2,3]	0,001
% Linf. T CD127+	29	90,9 [89,8-92,2]	18	92,3 [90,9-93]	0,029
% TCD4 CD127+	29	89,2 [88-90,7]	18	90,9 [89,9-92,1]	0,013

Tabla 8. Concentración en plasma de IL-7 (pg/ml) y porcentajes de linfocitos T y células TCD4+ que expresan el IL-7R α (CD127). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Además, observamos que existía una correlación directa entre el porcentaje de células que expresaban IL-7R α y el recuento absoluto tanto de TCD4+ ($r = 0,367$; $p = 0,023$) como de TCD8+ ($r = 0,475$; $p = 0,003$) [Figuras 26A y 26B]. Cuanto menor era la expresión de IL-7R α menor fue la cantidad de TCD4+ y TCD8+ en circulación. No encontramos diferencias significativas en cuanto a la intensidad media de fluorescencia (MFI) en linfocitos T totales (prematuros = 3577 ± 154 , término = 3755 ± 195 ; $p = 0,204$), ni tampoco en linfocitos TCD4+ (prematuros = 6499 ± 212 , término = 7117 ± 214 ; $p = 0,092$). Por tanto, no hay diferencias en cuanto a la cantidad de IL-7R α expresado por cada célula, pero la proporción de células que expresan el IL-7R α , y que por tanto son sensibles a la acción de la IL-7, fue inferior en neonatos prematuros.

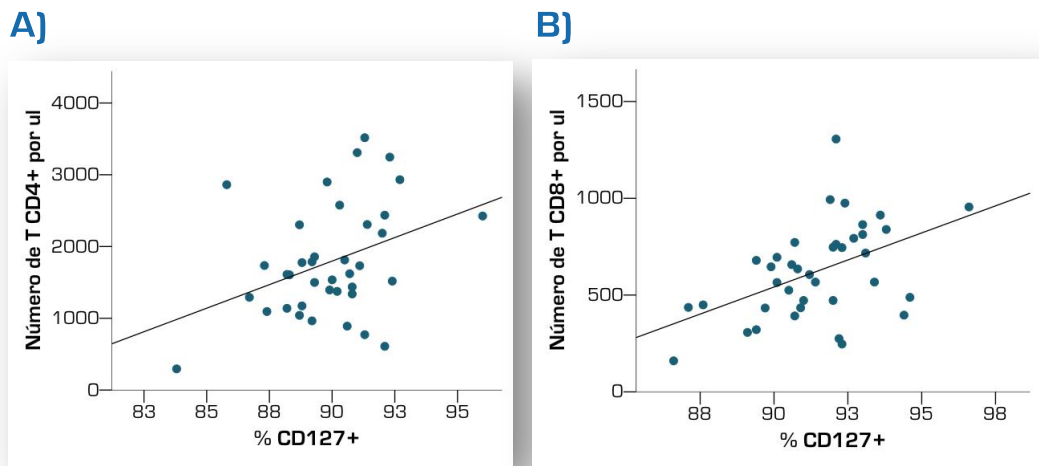


Figura 26. Correlación entre el porcentaje de células que expresan IL-7R α (CD127) y el número absoluto por μ l de linfocitos T CD4+ (A), T CD8+ (B).

Como se ha comentado anteriormente, los RTEs son linfocitos T que se han generado recientemente en el timo, son los precursores de los linfocitos T naive y por tanto, responsables de generar el repertorio de linfocitos T. Como se muestra en la tabla 6, no encontramos diferencias en cuanto a la proporción de estas células entre los dos grupos. Sin embargo, el valor absoluto de TCD4+ RTEs ($p = 0,025$) y TCD8+ RTEs ($p = 0,008$) fue muy inferior en prematuros que en neonatos nacidos a término. Dado que esta población de RTEs es especialmente dependiente de IL-7 para su supervivencia [73], analizamos si su bajo número podría relacionarse con la menor expresión de IL-7R α . Efectivamente, el análisis muestra que los valores absolutos tanto de TCD4+ RTE como de TCD8+ RTE se correlacionaban directamente con la proporción de células que expresaban IL-7R α ($p < 0.05$) [Figuras 27A y 27B].

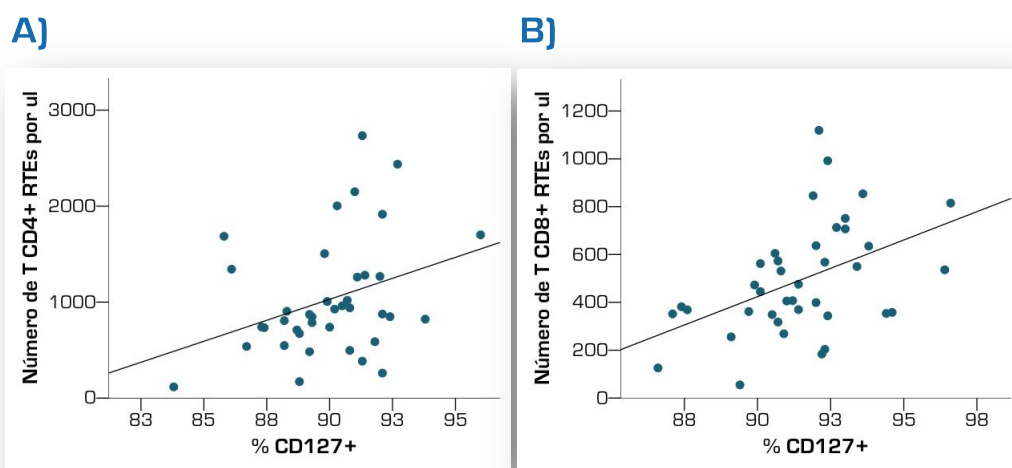


Figura 27. Correlación entre el porcentaje de células que expresan IL-7R α (CD127) y el número absoluto por μ l de linfocitos TCD4+ RTEs (A) y TCD8+ RTEs (B).

A modo de resumen, nuestros resultados indican que los neonatos prematuros presentan una marcada deficiencia cuantitativa en todas y cada una de las poblaciones inmunes analizadas, en comparación a los niños nacidos a término. La única población que no aparece disminuida en prematuros son las células Treg, probablemente debido al papel que juegan en la tolerancia materno-fetal. El carácter supresor de las Treg, unido a la deficiencia que observamos en los niveles de IL-7 y de su receptor IL-7R α , que son claves para la supervivencia de los linfocitos T, podrían estar implicados en la marcada leucopenia y linfopenia observada en neonatos prematuros.

4.2. Análisis inmunológico en niños con síndrome de DiGeorge

Una vez demostrado que los niños poseen desde el nacimiento valores adecuados (e incluso aumentados) de Treg, quisimos estudiar que efecto podría tener en el desarrollo normal del sistema inmune una disfunción o deficiencia en los valores de Treg. Para realizar este estudio, existe un modelo que se asemeja a estas condiciones que son los pacientes con síndrome de DiGeorge. Estos pacientes presentan un defecto cromosómico que consiste en una delección en el cromosoma 22 (22q11.2), y que se asocia a una disfunción tímica. Dado que las Treg tienen un origen tímico, analizamos si los valores de Treg en una cohorte de niños con síndrome de DiGeorge (SDG) asintomáticos (sin historial de infecciones recurrentes u otras alteraciones) estaban alterados con respecto a los de un grupo de controles sanos, y en tal caso que efectos podría tener sobre el sistema inmune la carencia de esta población. Se realizó un análisis comparativo de las distintas poblaciones inmunitarias y de las células Treg entre un grupo de 10 niños con SDG y 12 niños sanos de edades similares como grupo control.

4.2.1. Déficit de linfocitos T y disfunción tímica en niños con SDG

4.2.1.1 Características demográficas y poblaciones inmunes en niños con síndrome de DiGeorge

No se observaron diferencias significativas en cuanto a edad o sexo entre los dos grupos (Tabla 9). Los porcentajes (Tabla 9) y valores absolutos (Tabla 10) de monocitos, basófilos, neutrófilos y eosinófilos en los niños con SDG fueron comparables a los observados en el grupo control ($p > 0.05$). Estas poblaciones, al no tener un origen tímico no aparecen alteradas en el grupo SDG. Sin embargo, se observó una tendencia (aunque no fue estadísticamente significativa) a valores absolutos inferiores de linfocitos en el grupo SDG (Tabla 10). Al analizar las distintas subpoblaciones de linfocitos, observamos que los porcentajes y recuentos de las células que no tienen origen tímico, como células B, NK y NKT fueron comparables en ambos grupos ($p > 0.05$). Sin embargo las subpoblaciones que tienen origen tímico, TCD4+ y TCD8+, estaban marcadamente disminuidas en porcentaje (Tabla 9) y en número absoluto en el grupo SDG (Tabla 10).

	Pacientes SDG	Controles	Valor <i>P</i>
N	10	12	
Edad [años]	2,2 (1,2-5,8)	3,5 (2,4-4,3)	N.S.
Sexo (nº varones, %)	3 (30%)	4 (33%)	N.S.
% Monocitos #	10,5 (8,02-12,52)	7,03 (5,56-9,63)	N.S.
% Basófilos #	1,35 (1,05-1,60)	1,07 (0,78-1,27)	N.S.
% Neutrófilos §	91,15 (67,7-96,4)	89,59 (85,2-95,1)	N.S.
% Eosinófilos §	7,22 (3,02-31,6)	9,82 (2,98-13,79)	N.S.
% Linfocitos #	43,41 (28,9-49,6)	43,25 (36,6-54,4)	N.S.
▪ % TCD4+	30,28 (28,4-38,3)	35,78 (34,9-43,4)	0,016
▪ % TCD8+	12,48 (9,8-15,9)	19,42 (16,2-25,5)	0,004
▪ % Células NK	13,81 (9,9-28,7)	10,78 (7,04-14,72)	N.S.
▪ % Células NKT	0,43 (0,20-1,91)	0,72 (0,43-1,18)	N.S.
▪ % Linfocitos B	29,36 (19,0-38,9)	19,56 (15,2-24,7)	N.S.

Tabla 9. Características demográficas y porcentajes de las poblaciones inmunitarias. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). # Porcentaje con respecto al total de leucocitos. § Porcentaje con respecto al total de granulocitos. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N.S.: no significativo ($p > 0,05$).

	Pacientes SDG	Controles	Valor <i>P</i>
Monocitos	693 [421-780]	515 [266-885]	N.S.
Basófilos	75 [64-84]	74 [47-107]	N.S.
Neutrófilos	1623 [695-3301]	2240 [942-3303]	N.S.
Eosinófilos	183 [51-402]	220 [75-445]	N.S.
Linfocitos	3057 [2342-3612]	3452 [2709-4377]	0,177
▪ TCD4+	1003 [317-439]	1359 [1012-1558]	0,016
▪ TCD8+	356 [317-439]	700 [489-903]	0,004
▪ Células NK	423 [363-784]	322 [189-589]	N.S.
▪ Células NKT	11 [7-40]	22 [13-42]	N.S.
▪ Linfocitos B	793 [577-1283]	742 [454-996]	N.S.

Tabla 10. Valores absolutos (células por μl de sangre) de las poblaciones inmunitarias. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N.S.: no significativo ($p > 0,05$).

4.2.1.2 Análisis de la función tímica en niños con SDG

Dado que las únicas poblaciones que aparecían alteradas en los niños con SDG eran los linfocitos T, analizamos si efectivamente se debía a una disfunción tímica. Para ello, se cuantificaron los marcadores TREC mencionados previamente. Se cuantificó el ratio $\text{sj}/\beta\text{-TREC}$ que sería indicativo de la función o capacidad tímica y se encontraron valores ligeramente inferiores (pero no significativos) en el grupo SDG (Figura 28A). También se midieron individualmente los sj-TRECs y los $\beta\text{-TREC}$, que serían indicativos de la producción tímica de

nuevas células T [65, 74]. Los resultados mostraron que ambos marcadores presentaban una reducción de más de 5 veces en el grupo SDG en comparación con controles sanos (Figura 28B, 28C). Estos resultados sugieren que el tejido tímico presente en los niños con SDG mantiene una funcionalidad por gramo de tejido similar a la de individuos sanos. Sin embargo, la cantidad total de nuevas células T producidas por el timo es inferior en estos pacientes debido a que probablemente tengan menores cantidades totales de tejido tímico.

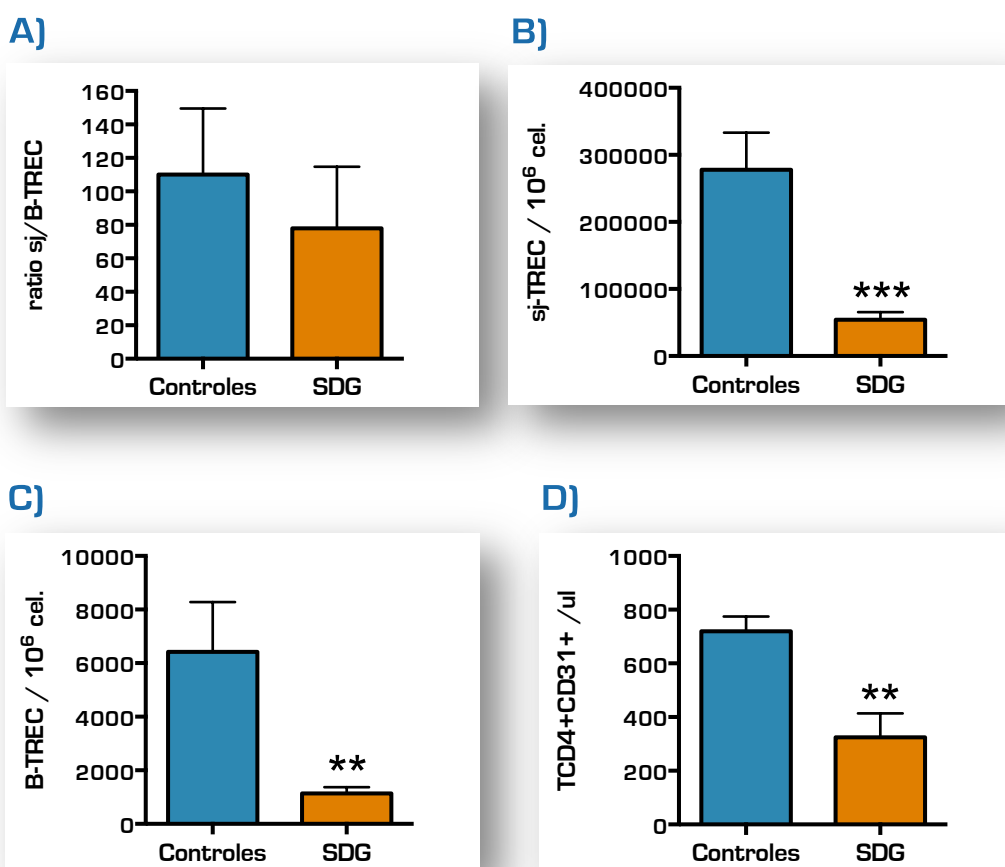


Figura 28. Ratio sj/ β -TREC (A), cantidad de sj-TREC por millón de células (B), cantidad de β -TREC por millón de células (C), valor absoluto de TCD4+ CD31+ (RTEs) por μ l de sangre. Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$.

Como se ha mencionado previamente el marcador CD31 identifica células TCD4+ naive que acaban de salir del timo y que tienen una baja historia proliferativa, por lo que se las considera RTEs. Coincidiendo con los resultados obtenidos en la cuantificación de TREC, este marcador de producción tímica también aparece disminuido en el grupo SDG (Figura 28D).

4.2.2. Alteraciones en la homeostasis contribuyen al déficit de linfocitos T

Al analizar el fenotipo de células TCD4+ y TCD8+ se observa que el número absoluto de células naive en ambas subpoblaciones está disminuido en el grupo SDG (Figura 29). La producción tímica (sj-TREC y β -TREC) se correlacionaba directamente con los recuentos de células naive TCD4+ y TCD8+ ($p < 0,05$), corroborando que la principal causa de la deficiencia de células T sería la deficiente producción tímica en niños con SDG. También se encontraron valores inferiores en el grupo SDG para la población de células TCD4+ memoria.

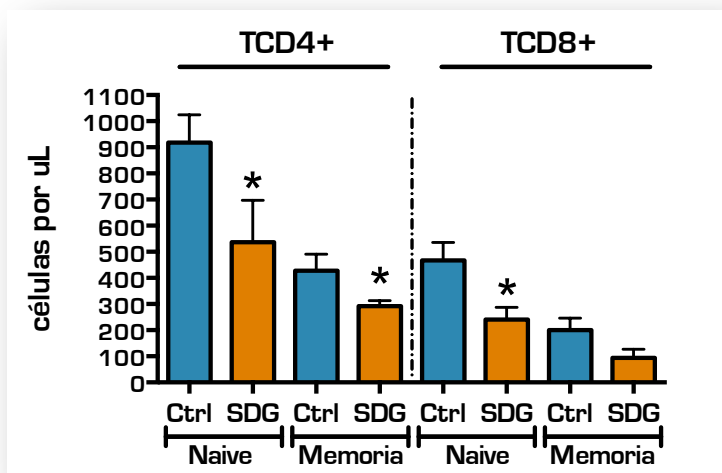


Figura 29. Valores absolutos de subpoblaciones de células TCD4+ y TCD8+ por µL de sangre. Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). *: $p < 0,05$.

Al analizar la proporción de cada subpoblación se observó que en niños con SDG el porcentaje de TCD4+ naive está disminuido ($p = 0.002$), mientras que el porcentaje de TCD4+ memoria estaba ligeramente aumentado (sin ser significativo estadísticamente). Sin embargo los porcentajes de células naive y memoria para la población TCD8+ fueron similares en el grupo control y SDG (Figura 30). Estos resultados sugieren que, además de la disfunción tímica, en la población de células TCD4+ también se está produciendo una desregulación de la homeostasis periférica.

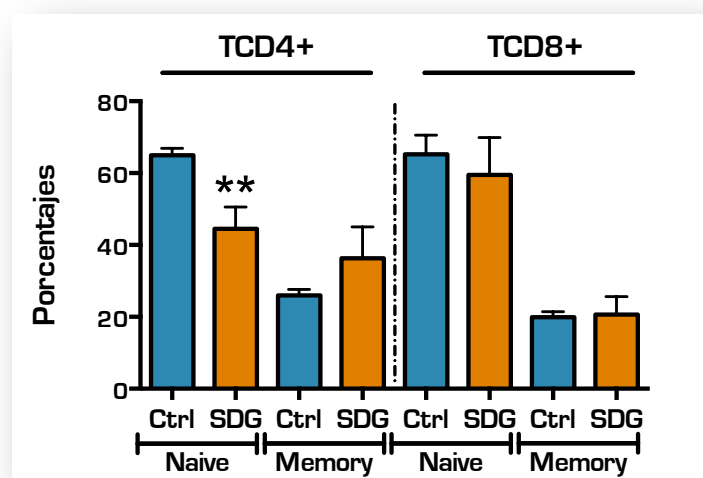


Figura 30. Porcentajes de subpoblaciones de células TCD4+ y TCD8+. Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). **: $p < 0,01$.

Por otro lado, también se observó una correlación directa entre los valores absolutos de TCD4+ naive y la cantidad de estas células que expresaban el marcador CD31 en ambos grupos. Sin embargo en el grupo SDG, un mismo valor de células TCD4+ naive se asoció con niveles inferiores de células CD31+ que en el grupo control ([Figura 31](#)). Dado que los valores de CD31 en TCD4+ se consideran un marcador indirecto de historia proliferativa [68], estos resultados ponen en evidencia que la población de células TCD4+ naive estaría experimentando un incremento en la proliferación periférica en el grupo SDG, probablemente como un mecanismo de compensación para mantener el pool de células TCD4+ a pesar de la deficiencia en la producción tímica de estas células.

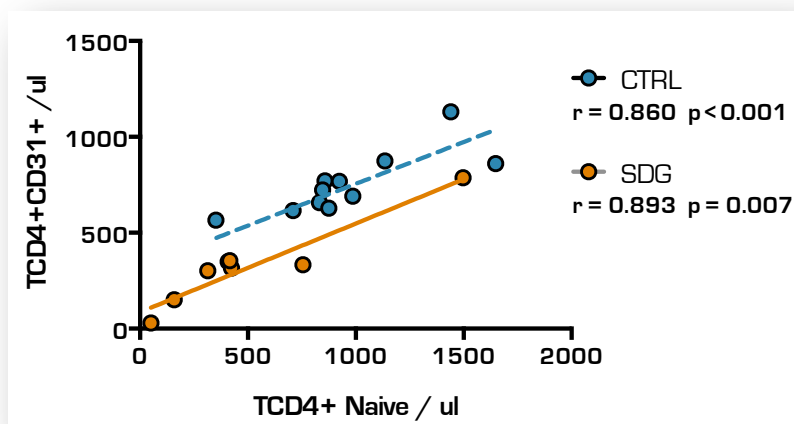


Figura 31. Correlación entre el número absoluto de células TCD4+ naive y el número absoluto por μl de linfocitos TCD4+ RTEs.

4.2.3. La expresión de IL-7R α en células TCD4+ está disminuida en niños con SDG

Como se ha comentado anteriormente la señal a través de IL-7 es crucial para la supervivencia y expansión de linfocitos T [71, 72] y se ha demostrado que es un mecanismo homeostático clave para mantener el pool de células TCD4+ naive cuando el timo no funciona correctamente [75]. Por lo tanto analizamos si en los niños con SDG existían alteraciones en la expresión del IL-7R α (CD127) por parte de las células T que podrían relacionarse con las alteraciones en la homeostasis observadas. Como se muestra en la [Figura 32](#), la expresión de IL-7R α en linfocitos T totales y en TCD4+ fue significativamente inferior en el grupo SDG. Sin embargo no se observaron diferencias de expresión para la

población TCD8+ ($p = 0,197$). Al calcular la intensidad media de fluorescencia (MFI) para IL-7R α , que sería proporcional a la cantidad de receptores expresados por cada célula, no encontramos diferencias entre grupos para ninguna de las poblaciones de linfocitos T.

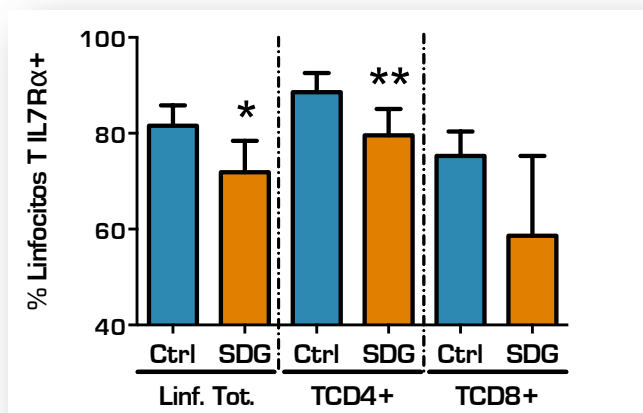


Figura 32. Porcentaje de linfocitos totales, TCD4+ y TCD8+ que expresan IL-7R α . Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$.

IL-7 y IL-7R α han demostrado ser cruciales para mantener el tamaño del “pool” de células TCD4+ naive cuando el timo sufre la involución asociada a la edad [75]. Por tanto, analizamos si los valores disminuidos de TCD4+ naive observados en el grupo SDG se asociaban con una menor expresión del IL-7R α . Los resultados mostraron que, mientras la mayoría de TCD4+ naive (> 90%) de los niños sanos expresaban IL-7R α , la frecuencia de células que expresaban este receptor fue muy inferior en el grupo SDG ($p = 0,002$) (Figura 33). En cuanto a la MFI o densidad

de IL-7R α en células TCD4+ naive no se observaron diferencias entre los dos grupos ($p = 0,968$).

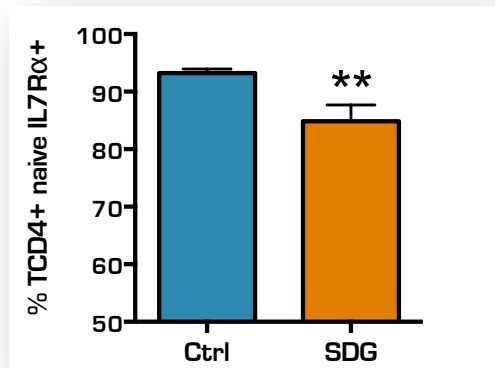


Figura 33. Porcentaje de linfocitos TCD4+ naive que expresan IL-7R α . Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). **: $p < 0,01$.

4.2.4. Valores y fenotipo de células Treg en niños con SDG

Las células Treg pueden presentarse en estado naive o como Treg memoria o activadas [70]. Al igual que otros linfocitos TCD4+, las células Treg se generarían en el timo con un fenotipo naive y estas células podrían activarse y proliferar transformándose en Treg activadas. De hecho, observamos que el número absoluto de Treg naive se correlacionaba directamente con los marcadores de producción tímica medida por sjTREC ($r = 0,680$; $p = 0,002$) (Figura 34) o por β -TREC ($p = 0,006$), confirmando su origen tímico. Estudiamos si la población Treg estaba afectada por la menor producción tímica en los niños con SDG y

observamos que efectivamente el número absoluto de Treg era inferior en el grupo SDG [$p = 0,047$] (Figura 35), mientras que no observamos diferencias en cuanto a su porcentaje.

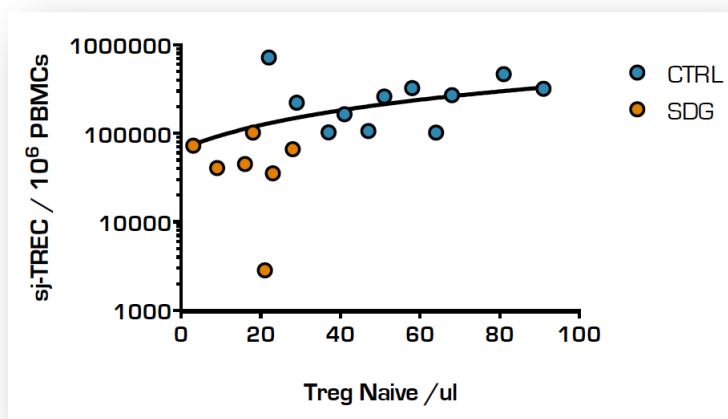


Figura 34. Correlación entre el número absoluto de células Treg naive y la cantidad de sj-TREC por millón de PBMCs.

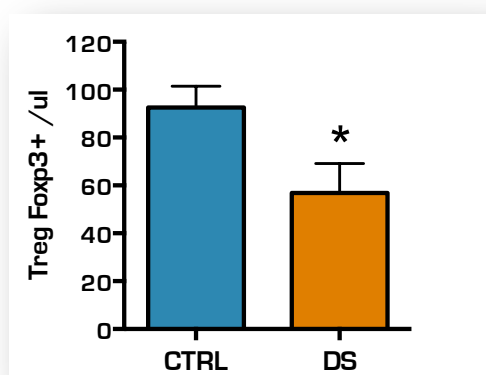


Figura 35. Número absoluto de células Treg (Foxp3+) por μ l de sangre. Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). *: $p < 0,05$.

La activación y la diferenciación de células Treg es un mecanismo implicado en la homeostasis periférica que permite restringir el aumento de células T activadas y que previene por tanto el que se de una proliferación excesiva de linfocitos. Los niños del grupo SDG, además de presentar valores absolutos inferiores de Treg mostraron diferencias en comparación a controles en cuanto a la distribución de estas Treg. Al determinar el fenotipo naive o memoria/activada en las Treg se observa que en el grupo SDG hay una menor proporción de Treg naive y una mayor proporción de Treg activadas que en el grupo control ([Figura 36](#)). Un detalle importante es que al calcular el ratio naive:activadas en las Treg observamos que este ratio estaba invertido en los niños SDG. El valor mediano [percentil 25-75] del ratio Treg naive:activadas en controles fue de 1,25 [1,12-1,73] mientras que en el grupo SDG fue de 0,65 [0,33-1,04] ($p = 0,010$).

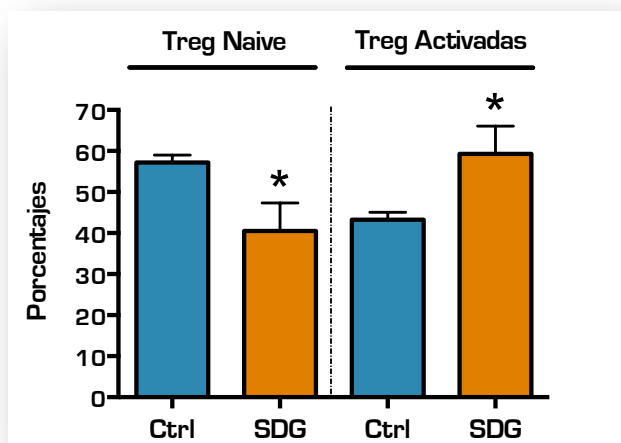


Figura 36. Porcentaje de células Treg naive y activadas. Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). *: $p < 0,05$.

Es decir, a diferencia de controles sanos que tienen más Treg naïve que activadas, en los niños con SDG se da una inversión del fenotipo y sus Treg tienen un fenotipo mayoritariamente activado. Estos resultados reflejan que existe una diferenciación de Treg naïve hacia Treg memoria/activadas en respuesta a la mayor proliferación de células TCD4+ naïve que se observó en los niños con SDG. De hecho, comprobamos que el porcentaje de Treg activadas se correlacionó inversamente con la cantidad de células TCD4+ naïve en circulación sólo en el grupo SDG y no en controles (Figura 37). Es decir, en los niños donde mayor era la caída de TCD4+ naïve o su diferenciación a células memoria se encontró una mayor proporción de Treg activadas.

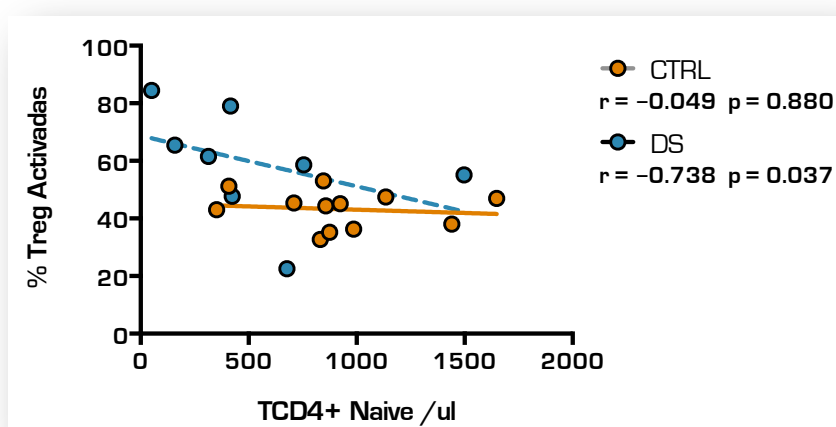


Figura 37. Correlación entre el número absoluto de células TCD4+ naïve y la proporción de células Treg activadas.

Además, encontramos que en el grupo SDG el porcentaje de Treg activadas se correlacionaba directamente con la frecuencia de TCD4+ activadas ($r = 0,899$; $p = 0,015$) y de TCD4+ efectoras ($r = 0,695$; $p = 0,056$), lo cual indica que las Treg activadas podrían estar aumentando proporcionalmente a medida que aumenta la proporción de células

activadas y efectoras con el fin de controlar su expansión. Sin embargo, esta asociación de las Treg activadas con la proporción de TCD4+ activadas y efectoras no se observó en el grupo control ($r = 0,350$; $p = 0,265$ para TCD4+ activadas y $r = 0,238$; $p = 0,456$ para TCD4+ efectoras) [Figuras 38A, 38B], probablemente debido a que la proporción de estas células TCD4+ es mucho más estable y homogénea en controles.

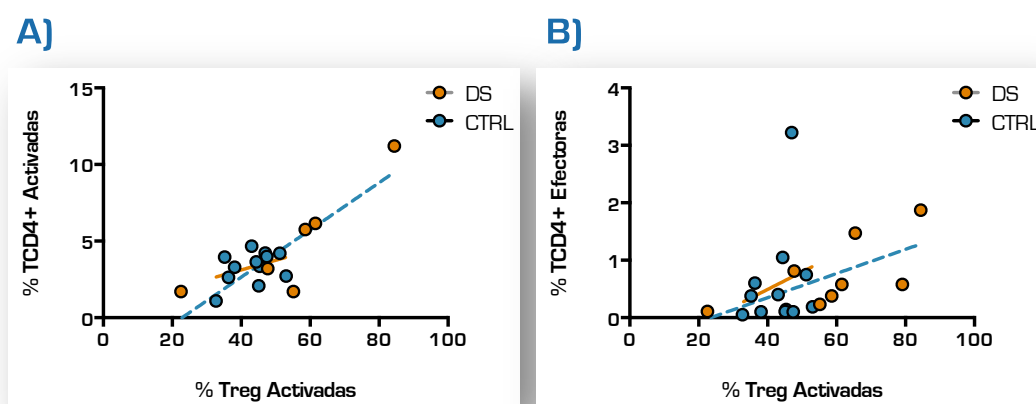


Figura 38. Correlación entre la proporción de células Treg activadas y el porcentaje de células TCD4+ activadas (A) y TCD4+ efectoras (B).

Resumiendo, nuestros resultados muestran que los niños con SDG presentan una disfunción en la producción tímica de linfocitos T que conduce a una deficiencia en la cantidad de células TCD4+ y TCD8+ naive. En el caso de la población TCD8+, no se encontraron evidencias de un mecanismo compensatorio que intente normalizar los valores en periferia de esta población, y las proporciones de TCD8+ naive y memoria fueron similares a las observadas en niños sanos. Sin embargo, para la población TCD4+ hallamos evidencias de que existe una mayor

historia proliferativa y una expresión disminuida del IL-7R α , lo cual estaría favoreciendo la diferenciación de células TCD4+ naive hacia células TCD4+ memoria o activadas. El aumento en la proliferación y/o diferenciación de esta población TCD4+ activaría el mecanismo homeostático mediado por Treg, invirtiendo su fenotipo y aumentando la proporción de Treg activadas. Todo ello con el objetivo de asegurar que la expansión de linfocitos T permanezca bajo control evitando así un desequilibrio homeostático y una hiperactivación del sistema inmune. Sin embargo, la diferenciación y pérdida tanto de células TCD4+ naive como de Treg, que provocan que sus valores absolutos sean menores, podrían tener consecuencias a largo plazo y podría estar detrás de la mayor incidencia de enfermedades autoinmunes que se da en pacientes con SDG.

4.3. Factores inmunológicos implicados en la inducción de tolerancia en niños alérgicos

Las alergias alimentarias son muy comunes en la infancia y su prevalencia y persistencia está aumentando en los últimos años. Sin embargo, en muchos casos estas alergias pueden resolverse espontáneamente o mediante el uso de inmunoterapias orales. La inducción de tolerancia específica mediante la administración oral de dosis crecientes de un alérgeno (SOTI) ha demostrado tener un alto índice de éxito. Sin embargo, se desconocen los mecanismos inmunológicos que conducen a esta adquisición de tolerancia o desensibilización. Uno de los principales candidatos en mediar este proceso son las células Treg, que en modelos animales han demostrado ser clave en controlar las respuestas alérgicas y conducir a la tolerancia [59, 76-78]. Sin embargo, se desconoce que papel juegan estas células en la alergia pediátrica y su implicación en la adquisición de tolerancia. Por todo ello, realizamos un estudio en un total de 19 niños alérgicos al huevo que fueron enrolados en un protocolo SOTI para desensibilizarlos. Se hizo un análisis exhaustivo de las distintas poblaciones inmunitarias comparando para cada niño una muestra antes de la primera administración de alérgeno (TO) con otra muestra recogida cuando el niño ya era tolerante (Tend). De esta manera se pretendió determinar qué cambios inmunológicos o qué poblaciones celulares eran responsables o estaban implicadas en la adquisición de tolerancia.

4.3.1. Sujetos de estudio y adquisición de tolerancia

El análisis inmunológico se realizó en un grupo de 19 niños alérgicos al huevo tratados con SOTI con un rango de edades de 4-14 años, y un grupo de 22 niños sanos como grupo control con edades comprendidas entre 3-13 años. No existían diferencias de edad entre grupos ($p = 0.072$), siendo la edad media (\pm E.E.M.) en el grupo SOTI de $9,23 \pm 0,68$ años, y de $7,20 \pm 0,82$ años en el grupo control. Un total de 16 de los 19 niños alcanzaron la tolerancia completa al huevo, lo que constituye un éxito del 84,2%. Se consideró que un niño había alcanzado la tolerancia completa cuando era capaz de ingerir 10 gr de huevo en polvo (el equivalente a un huevo entero) sin presentar ninguna reacción adversa. El tiempo medio que transcurrió desde el inicio de SOTI hasta la adquisición de tolerancia fue de $9,7 \pm 0,9$ semanas. El tratamiento SOTI no consiguió desensibilizar a 2 niños, que debieron interrumpir el tratamiento debido a la aparición de reacciones anafilácticas, y consiguió una tolerancia parcial en un niño que paso a tolerar el huevo cocido pero que permaneció sensible al huevo crudo.

4.3.2. SOTI sólo modifica los valores de determinadas subpoblaciones de linfocitos TCD4+

Se analizó qué poblaciones inmunes fueron modificadas entre T0 y Tend en los 16 niños que habían alcanzado una tolerancia completa. Sorprendentemente, los porcentajes [Tabla 11] y los valores absolutos [Tabla 12] de todas y cada una de las poblaciones analizadas no experimentaron ningún cambio con SOTI.

	T0	Tend	Valor <i>P</i>
% Monocitos #	5,63 [4,91-7,38]	6,54 [4,95-7,93]	N.S.
% Basófilos #	1,26 [0,91-1,87]	1,18 [0,74-1,57]	N.S.
% Granulocitos #	49,40 [42,8-55,4]	48,31 [40,8-52,1]	N.S.
% Neutrófilos §	84,17 [74,3-87,7]	84,06 [76,4-90,2]	N.S.
% Eosinófilos §	14,36 [10,9-23,6]	14,25 [8,9-20,0]	N.S.
% Linfocitos #	40,1 [30,9-45,4]	41,1 [35,5-43,3]	N.S.
▪ % TCD4+	39,9 [34,7-42,7]	41,2 [37,6-42,4]	N.S.
▪ % TCD8+	24,4 [21,5-26,7]	22,2 [20,4-25,4]	N.S.
▪ % Células NK	9,39 [6,9-10,2]	8,07 [7,2-10,8]	N.S.
▪ % Células NKT	1,22 [0,9-2,1]	1,44 [1,0-1,8]	N.S.
▪ % Linfocitos B	15,2 [12,5-18,6]	15,8 [13,4-18,1]	N.S.

Tabla 11. Porcentajes de las poblaciones inmunitarias antes de SOTI (T0) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). # Porcentaje con respecto al total de leucocitos. § Porcentaje con respecto al total de granulocitos. N.S.: no significativo ($p>0,05$).

	TO	Tend	Valor <i>P</i>
Monocitos	327 (263-475)	383 (286-506)	N.S.
Basófilos	71 (52-86)	75 (52-87)	N.S.
Granulocitos	2624 (1772-3911)	2499 (2096-3207)	N.S.
▪ Neutrófilos	2084 (1530-3337)	1982 (1744-2654)	N.S.
▪ Eosinófilos	339 (231-660)	460 (274-631)	N.S.
Linfocitos	2217 (1750-2818)	2533 (2030-2892)	N.S.
▪ TCD4+	804 (697-1090)	942 (881-1220)	N.S.
▪ TCD8+	548 (390-695)	600 (453-703)	N.S.
▪ Células NK	185 (153-270)	204 (152-260)	N.S.
▪ Células NKT	33 (20-48)	38 (22-44)	N.S.
▪ Linfocitos B	353 (203-507)	375 (287-493)	N.S.

Tabla 12. Valores absolutos (células por μ l de sangre) de las poblaciones inmunitarias antes de SOTI (TO) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). N.S.: no significativo ($p>0,05$).

4.3.2.1 Análisis de subpoblaciones de linfocitos T

Al analizar las distintas subpoblaciones de linfocitos T se observó una disminución significativa en el porcentaje y número absoluto de células TCD4+ efectoras [también denominadas memoria-efectoras o Tem], que constituyen un elemento clave en la respuesta alérgica [Tabla 13, Tabla 14]. El porcentaje de las demás poblaciones analizadas no mostró ningún cambio con SOTI. Al analizar el número absoluto [cantidad de células circulantes], además de la disminución de Tem, también encontramos que las células TCD4+ RTE

aumentaban significativamente tras SOTI lo cual indicaba una mayor generación de nuevas células TCD4+ por parte del timo (Tabla 14).

	T0	Tend	Valor <i>P</i>
% Linfocitos TCD4+			
% Naive •	57,1 [52,9-62,6]	58,1 [50,4-68,8]	N.S.
% Activadas •	3,92 [3,0-4,8]	3,92 [2,3-5,8]	N.S.
% Memoria •	34,2 [29,2-36,4]	30,6 [25,6-36,8]	N.S.
% Tem •	0,56 [0,45-1,5]	0,29 [0,16-0,58]	0,017
% RTEs •	42,4 [39,2-49,2]	43,5 [40-56,1]	N.S.
% CD38/ROneg •	42,6 [31,4-51,7]	50,4 [42,6-57,6]	N.S.
% Linfocitos TCD8+			
% Naive #	57,5 [51,7-63,6]	57,6 [51,3-65,6]	N.S.
% Activadas #	4,18 [2,0-6,7]	6,68 [2,4-8,3]	N.S.
% Memoria #	24,8 [16,6-25,6]	22,6 [16,1-28,4]	N.S.
% Tem #	14,5 [3,9-22,1]	15,5 [10,8-20,3]	N.S.
% RTEs #	55,9 [46,1-58,6]	51,5 [48,2-61,4]	N.S.

Tabla 13. Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T antes de SOTI (T0) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). • Porcentaje con respecto al total de linfocitos T CD4+. # Porcentaje con respecto al total de linfocitos T CD8+. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

	TO	Tend	Valor <i>P</i>
Linfocitos TCD4+			
Naive	477 [382-625]	621 [478-758]	N.S.
Activadas	36 [26-48]	41 [27-73]	N.S.
Memoria	287 [242-410]	329 [253-418]	N.S.
Tem	5 [3-12]	3 [1.2-4.7]	0,032
RTEs	368 [277-489]	514 [404-650]	0,041
CD38/ROneg	353 [263-596]	638 [415-718]	0,003
Linfocitos TCD8+			
Naive	303 [254-372]	327 [286-365]	N.S.
Activadas	22 [11-44]	51 [13-63]	N.S.
Memoria	140 [79-193]	150 [115-231]	N.S.
Tem	76 [22-125]	95 [59-134]	N.S.
RTEs	270 [227-316]	322 [263-355]	N.S.

Tabla 14. Valores absolutos (células por μl de sangre) de subpoblaciones de linfocitos T antes de SOTI (TO) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

Otra de las poblaciones que experimentó cambios con SOTI fue una subpoblación particular de células TCD4+ que presentaba el siguiente fenotipo: CD4+CD38+CD45RO–, y que llamaremos “CD38/ROneg” Esta subpoblación fue la única junto con las TCD4+ RTE que experimentó un aumento en su valor absoluto a Tend, que en este caso casi duplicó su valor. La molécula CD38 se ha considerado un marcador de activación, pero al analizar de forma más exhaustiva

esta población observamos que estas células CD38/ROneg no expresaron HLA-DR [el marcador definitorio de activación en TCD4+] ni tampoco CD45RO [que está presente en las células TCD4+ memoria y activadas] (Figura 39). Además, el recuento de estas células CD38/ROneg mostró una correlación positiva con la cantidad de TCD4+ RTE [$r = 0,769$; $p = 0,003$], lo que indica que su aumento está relacionado con una mayor producción tímica y que podría tratarse de células generadas *de novo* (Figura 40).

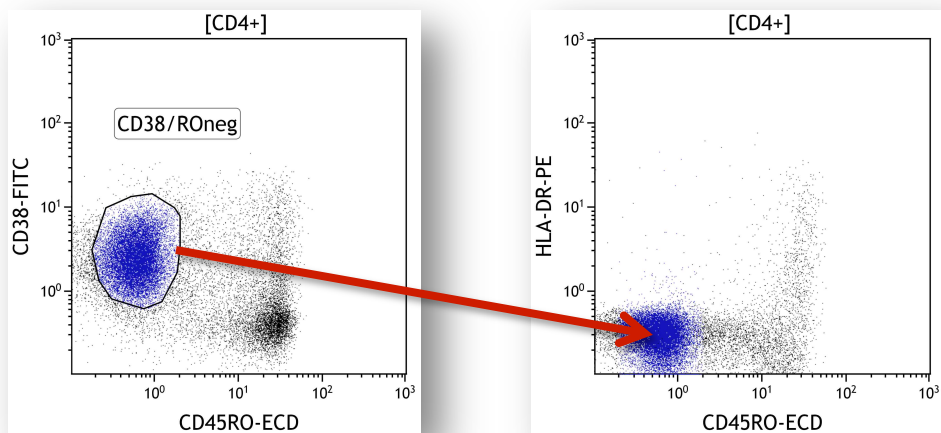


Figura 39. Dot-plots de un paciente representativo donde se muestra la población de células TCD4+ CD38/RO– y la ausencia de expresión de HLA-DR.

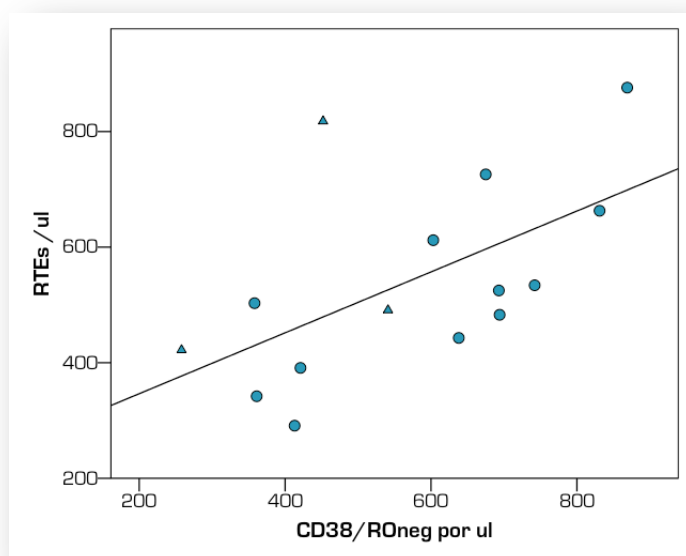


Figura 40. Correlación entre el valor absoluto de células CD38/ROneg y de células TCD4+ RTE.

4.3.2.2 Diferencias entre niños alérgicos y sanos en las poblaciones de linfocitos T

También comparamos los valores de las distintas poblaciones inmunes en niños alérgicos con los de niños sanos de edades comparables. Antes del inicio de SOTI (T0), los niños con alergia tenían un porcentaje y número absoluto de Tem superiores que los observados en niños no alérgicos ($p < 0,05$), y al completar SOTI fue interesante observar que estos valores se normalizaron y volvieron a valores similares a los de controles [Figura 41A, 41B]. De forma similar, el porcentaje y valores absolutos de células CD38/ROneg aparecieron muy disminuidos en niños alérgicos al compararlos con controles ($p < 0,01$) y estos valores se normalizaban tras alcanzar la tolerancia con SOTI [Figura 42A, 42B]. Además, fue interesante

constatar que los 3 únicos niños que no alcanzaron una tolerancia completa no mostraron ninguna recuperación de CD38/ROneg entre el inicio de SOTI y la última muestra obtenida, e incluso disminuyeron sus valores. El porcentaje de CD38/ROneg en estos 3 niños pasó de una media (\pm E.E.M.) $TO = 40,4 \pm 6,3 \rightarrow Tend = 33,4 \pm 4,1$ y lo mismo ocurrió con los valores absolutos $TO = 442 \pm 125 \rightarrow Tend = 394 \pm 68$. Es decir, los niños alérgicos presentan mayor cantidad de Tem, que participarían en el proceso alérgico, y menos células CD38/ROneg que un niño no alérgico. Al tratar a los niños con SOTI, se consiguen normalizar estas dos poblaciones que vuelven a valores normales, lo que indica que esta nueva población de CD38/ROneg podría ser una población implicada en la desensibilización y constituir un marcador de tolerancia.

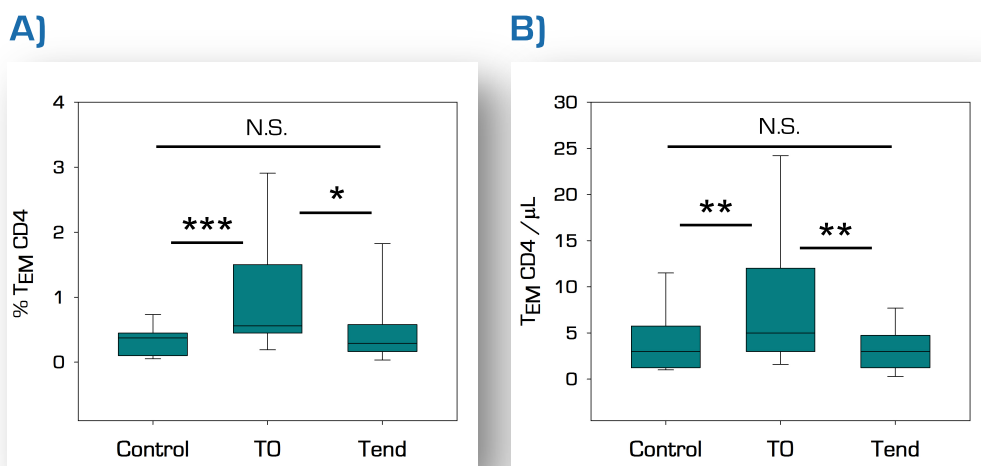
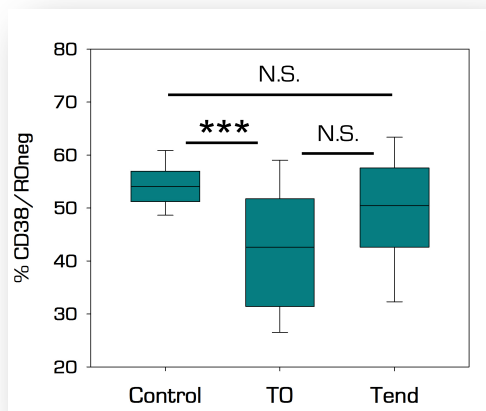


Figura 41. Porcentajes (A) y valores absolutos (células por μ L de sangre) (B) de células TCD4+ efectoras (Tem CD4). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75) y las barras de error representan los percentiles 90-10. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

A)



B)

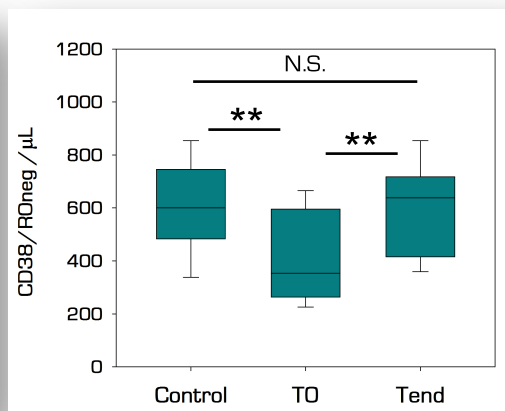


Figura 42. Porcentajes (A) y valores absolutos (células por μL de sangre) (B) de células TCD4⁺ CD38/ROneg. Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75) y las barras de error representan los percentiles 90-10. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

4.3.3. Cambios en la población Treg en niños tratados con SOTI

Los resultados mostraron que la adquisición de tolerancia con SOTI estaba asociada con un aumento significativo en la frecuencia y en los valores absolutos de células Treg [Tabla 15, Figura 43]. Al analizar el fenotipo de estas Treg, no encontramos cambios en cuanto a la proporción de Treg naïve o Treg efectoras a Tend. Sin embargo, el aumento en el número absoluto de Treg fue más marcado para la población de Treg efectoras [Tabla 15].

	TO	Tend	Valor p
% Treg Totales #	7,89 [7,11-9,99]	8,42 [7,41-9,81]	0,010
% Treg Naïve •	48,35 [43,7-55,2]	51,88 [44,5-55,6]	N.S.
% Treg efectoras •	52,21 [45,4-56,5]	48,64 [45,0-56,1]	N.S.
Treg Totales	73 [49-93]	84 [61-105]	0,037
Treg Naïve	34 [24-49]	39 [32-59]	N.S.
Treg efectoras	35 [26-48]	43 [31-55]	0,031

Tabla 15. Porcentajes y valores absolutos (células por μ l de sangre) de subpoblaciones de células Treg antes de SOTI (TO) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). # Porcentaje con respecto al total de linfocitos TCD4+. • Porcentaje con respecto al total de Treg. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

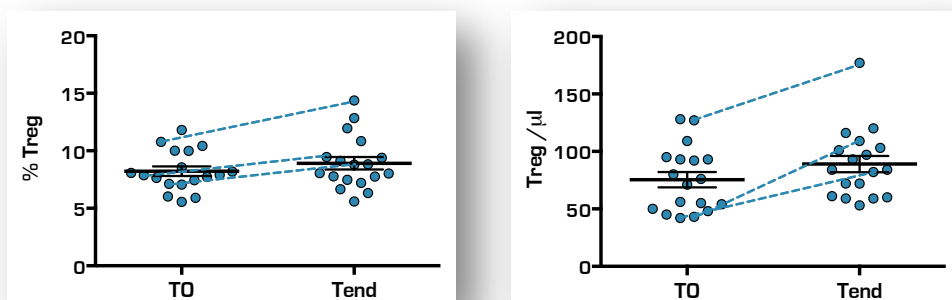


Figura 43. Porcentajes y valores absolutos (células por μ l de sangre) de subpoblaciones de células Treg antes de SOTI (T0) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Las líneas punteadas representan la evolución de los valores de Treg para 3 pacientes representativos. Las líneas horizontales representan la media (\pm E.E.M.).

El aumento de células Treg observado puede jugar un papel clave suprimiendo y normalizando los valores de células efectoras, y conduciendo a la tolerancia. Sin embargo, se desconoce como se originan estas Treg. Nuestros datos muestran un ligero aumento en el número absoluto de Treg naïve, por tanto no podemos descartar que la mayor producción tímica, reflejada en el aumento de RTE [Tabla 14], sea responsable del aumento de Treg. Sin embargo, el mayor aumento en la población de Treg efectoras apunta a una inducción periférica de células Treg a partir de células TCD4+ naïve [79].

4.3.3.1 Efecto del aumento de Treg en las células efectoras implicadas en el proceso alérgico

Se ha descrito que la respuesta inmune frente a alérgenos en individuos sanos o alérgicos es el resultado del equilibrio entre Treg y células T efectoras, y un cambio en la población dominante puede conducir al desarrollo de alergias o bien a la adquisición de tolerancia

[61]. Analizamos el ratio entre Treg y células Tem y encontramos que este ratio experimentó un aumento de 2,3 veces a Tend ($p = 0,010$), alcanzando valores similares a los observados en el grupo control (Figura 44). SOTI podría estar induciendo la generación de Treg efectoras sin aumentar la población Tem. Este hecho unido al efecto supresor de las Treg sobre las células efectoras explicaría el cambio tan marcado en el ratio Treg/Tem.

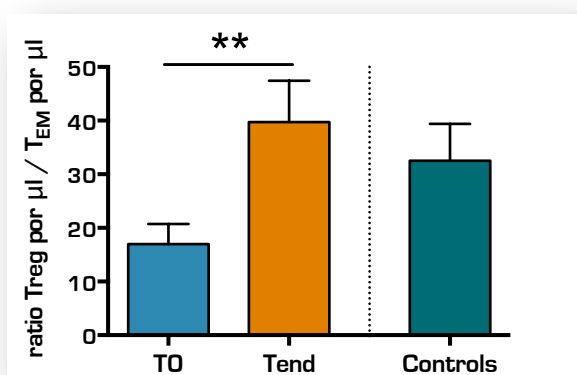


Figura 44. Ratio entre los valores absolutos (células por µl de sangre) de células Treg y Tem antes de SOTI (TO) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Las gráficas representan el valor medio (+E.E.M). *: $p < 0,05$.

A continuación, analizamos si el descenso de células Tem que se observó en los pacientes que alcanzaban la tolerancia podría estar asociado al aumento de Treg. Los resultados mostraron que en niños alérgicos, los valores altos de Treg en circulación se correlacionaron con una menor proporción de células Tem. Sin embargo, esta correlación no se observó en el grupo de niños sanos (Figura 45). Por tanto, podemos concluir que la normalización en la frecuencia de células Tem descrita en el apartado anterior estaría asociada a un incremento en el número de Treg en circulación.

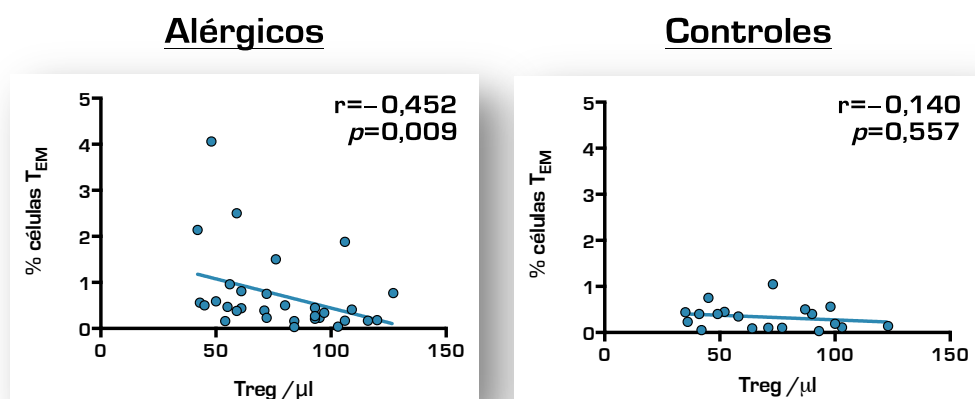


Figura 45. Correlación entre el valor absoluto de células Treg (por μl de sangre) y el porcentaje de células Tem en niños alérgicos y en controles sanos. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Se ha descrito que los basófilos producen citoquinas como IL-4 e IL-13 que son claves para las manifestaciones de la enfermedad alérgica, por lo que también son un elemento importante en la tolerancia a alérgenos alimentarios. Las citoquinas inflamatorias producidas por las células TCD4⁺ efectoras son esenciales para la expansión y activación de basófilos y mastocitos. Por todo ello, analizamos cómo el balance entre células Treg y células Tem podría afectar a basófilos o granulocitos. No hallamos ninguna correlación entre Tem y eosinófilos o neutrófilos ($p > 0,05$). Sin embargo, en los niños alérgicos observamos una correlación directa entre la frecuencia de Tem y la cantidad de basófilos en circulación ([Figura 46](#)), pero esta correlación no aparecía en el grupo control. También observamos que en los niños alérgicos se daba una correlación negativa entre las Treg y el porcentaje de basófilos que no fue encontrada en controles ([Figura 47](#)), indicando que los niños alérgicos que presentaron una mayor proporción de basófilos fueron aquellos con menor cantidad de Treg en circulación. No encontramos cambios significativos en el porcentaje o número absoluto de basófilos entre TO y Tend ([Tablas 11 y 12](#)). Sin embargo, los resultados sugieren que en

los niños alérgicos los valores de basófilos y Tem están relacionados, y la recuperación del balance Treg/Tem gracias a SOTI podría contribuir a la normalización de los valores de basófilos y la desaparición de los síntomas de la alergia.

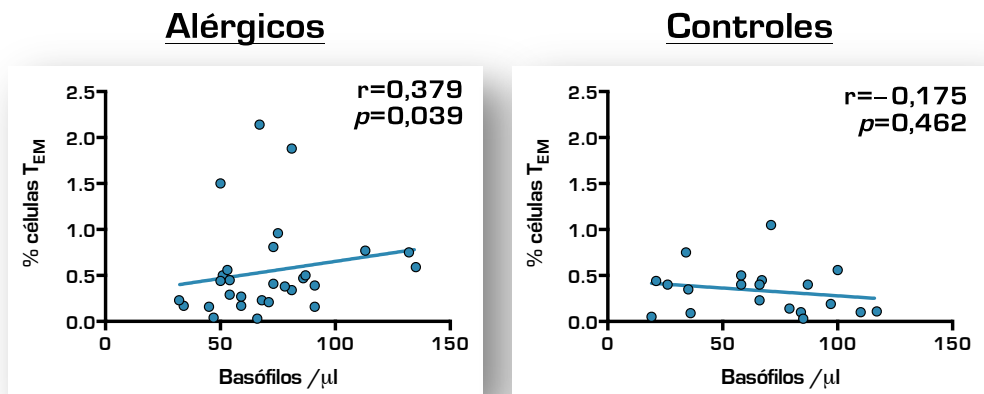


Figura 46. Correlación entre el valor absoluto de basófilos (por μl de sangre) y el porcentaje de células Tem en niños alérgicos y en controles sanos. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$.

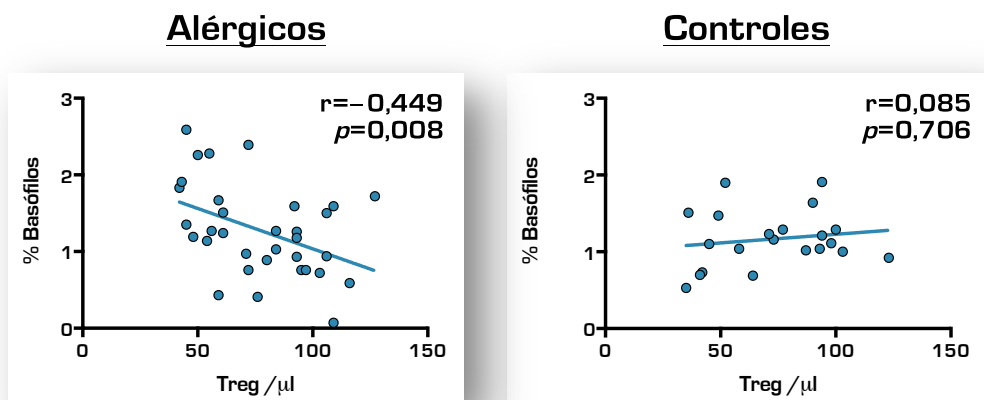


Figura 47. Correlación entre el valor absoluto de Treg (por μl de sangre) y el porcentaje de basófilos en niños alérgicos y en controles sanos. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$.

4.3.4. SOTI aumenta los valores plasmáticos de IgG específicas

Se cuantificaron los valores de IgE total, IgE específicas, y los valores de IgG específica frente a clara de huevo en los niños alérgicos a TO y Tend. El análisis indica que la IgE total y distintas IgE específicas (clara, ovoalbúmina y ovomucoide) no experimentaron cambios tras la terapia SOTI, pero los valores de IgG frente a clara aumentaron significativamente a Tend ($p = 0,002$) (Tabla 16). Además, el análisis de correlación entre variables en niños alérgicos (uniendo TO y Tend) indica que los valores de IgG frente a clara se correlacionan positiva y únicamente con los valores absolutos de células CD38/ROneg ($r = 0,440$; $p = 0,007$).

	TO	Tend	Valor P
IgE [total] [kU/L]	738 [282-1578]	772 [329-1550]	N.S.
IgE clara	8,18 [3,6-14,2]	9,51 [4,1-15,1]	N.S.
IgE ovoalbúmina	4,63 [3,0-12,4]	4,61 [1,7-7,9]	N.S.
IgE ovomucoide	6,08 [2,2-12,8]	8,30 [2,6-17,8]	N.S.
IgG clara [mg/L]	5,02 [3,2-7,0]	20,8 [8,2-44,5]	0,002

Tabla 16. Valores en plasma de IgE total y específicas, y de IgG específica frente a clara antes de SOTI (TO) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Los valores se muestran como medianas (percentiles 25-75). Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

4.3.5. SOTI modifica las concentraciones plasmáticas de distintas citoquinas

Se cuantificó en cada paciente a T0 y Tend la concentración en plasma de distintas citoquinas de tipo Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22 ([Tabla 16](#)). La concentración en plasma de IL-6 fue indetectable en todos los niños y no se encontraron diferencias significativas para IL-12, IL-4, IL-13, y IL-1 β ($p > 0,05$). Sin embargo, al finalizar SOTI (Tend), los niños mostraron una marcada disminución en la concentración de algunas citoquinas de tipo Th1 como IL-2, TNF- α , e IFN- γ . También observamos un descenso en citoquinas Th2 como IL-5, e IL-10; tipo Th9 como IL-9; citoquinas Th22 como IL-22 y citoquinas Th17 como IL-17A ([Tabla 17](#)). Aunque no se encontraron diferencias significativas para IL-13 entre T0 y Tend, fue la única citoquina que mostró un aumento tras SOTI ([Tabla 17](#)).

	T0	Tend	Valor <i>p</i>
Th1 cytokines			
IL-2	125,05 (±36,4)	27.53 (±14,2)	0,041
IFN-γ	174.69 (±57.4)	42.15 (±27.2)	0,036
IL-12	42.43 (±25.2)	< 1.5*	N.S.
TNF-α	30.73 (±12)	< 3.2*	0,046
Th2 cytokines			
IL-4	88.49 (±29.8)	25.32 (±12.1)	N.S.
IL-5	75.95 (±27.9)	3.31 (±3.2)	0,028
IL-10	36.94 (±12)	12.9 (±4.4)	0,025
IL-13	119.76 (±33.2)	158.86 (±17.9)	N.S.
Others			
IL-9	76.15 (±29.8)	51.2 (±40.9)	0,021
IL-17A	279.96 (±68.6)	197.94 (±103.1)	0,006
IL-22	467.47 (±104)	275.73 (±68.2)	0,028
IL-1β	140.33 (±38.8)	67.07 (±43.8)	N.S.

Tabla 17. Valores en plasma de distintas citoquinas antes de SOTI (T0) y al alcanzar la tolerancia (Tend). Los valores se muestran como medias (±E.E.M.). *: La concentración de citoquina fue indetectable en más del 40% de las muestras. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. N. S.: no significativo ($p > 0,05$).

A modo de resumen, podemos decir que los niños alérgicos presentan unos valores elevados de células Tem que empujarían un papel clave en el desarrollo del proceso alérgico mediante la producción de citoquinas inflamatorias y la activación de otros tipos celulares como los basófilos. La administración oral de dosis crecientes del alérgeno (SOTI) consigue inducir tolerancia en la mayoría de los casos desensibilizando completamente a los niños tratados. Cabría esperar que la adquisición de tolerancia estaría mediada por profundos cambios en el sistema inmune. Sin embargo, nuestros datos revelan que no se producen cambios en la mayoría de poblaciones inmunitarias, y tan sólo se ven alterados los valores de unas subpoblaciones de linfocitos TCD4+ muy concretas. Los valores de Tem, aumentados en niños alérgicos, se normalizan tras el tratamiento SOTI recuperando niveles similares a los de controles no alérgicos. Además, identificamos una población de células CD38/ROneg que está muy disminuida en alérgicos y que se restablece tras SOTI, pudiendo constituir un marcador de tolerancia. La población Treg, que dado su carácter supresor podría ser clave en el control de las respuestas alérgicas, experimenta un aumento significativo con SOTI que además se correlaciona con la disminución de células efectoras asociadas al proceso alérgico (Tem y basófilos). Además de la normalización de los valores de estas células efectoras, observamos un aumento de IgG específica y una marcada disminución de los niveles plasmáticos de diversas citoquinas, lo cual podría ser responsable de la desaparición de síntomas o respuestas frente al alérgeno en los niños que han sido desensibilizados.

5. DISCUSIÓN

5. Discusión

En esta memoria se ha estudiado una subpoblación de células TCD4+ con función supresora, que son las células Treg [5], analizando su papel en la homeostasis inmune durante la infancia. Sin embargo, la información que aporta el estudio aislado de una subpoblación inmune es muy limitado, por lo que en cada estudio se ha realizado un análisis exhaustivo de las distintas poblaciones inmunitarias. Esto ha permitido correlacionar los valores de Treg con los de otras poblaciones o parámetros inmunológicos y así establecer el efecto que la caída o aumento de Treg puedan tener sobre la homeostasis inmunológica.

El estudio de cada una de las poblaciones inmunes se ha realizado mediante el uso de marcadores que identifican a cada uno de los tipos celulares, y equipos de citometría de flujo punteros que permiten el análisis simultaneo de hasta 10 marcadores distintos. Esto nos ha permitido determinar el fenotipo de un gran número de poblaciones inmunitarias a partir de una muestra mínima de sangre periférica, lo cual permite que las conclusiones obtenidas en esta memoria puedan ser llevadas a la práctica clínica fácilmente sin el uso de técnicas invasivas. Existen numerosos estudios en los que se mide el porcentaje o proporción de las distintas poblaciones inmunitarias. Sin embargo, la determinación del porcentaje no deja de ser una medida de proporción o frecuencia relativa al resto de las poblaciones; de tal manera que una bajada en el porcentaje de un determinado subtipo celular puede ser secundaria al aumento de otra población aunque la cantidad de ese subtipo celular no haya sufrido ninguna modificación. Por ello, en esta memoria se ha dado especial relevancia al número absoluto de las poblaciones inmunes, que es una medida más fiable de la cantidad de células en circulación, y por tanto de la capacidad inmunológica del individuo.

5.1. Leucopenia en neonatos prematuros y valores aumentados de Treg

El punto a lo largo de la gestación en el que el embrión comienza a desarrollar un sistema inmunitario competente se ha establecido en torno a la semana 20-24. Durante muchos años se ha asumido que las células T neonatales eran inmaduras, y que por tanto sus diferencias con respecto a adultos eran meramente cualitativas. Sin embargo, algunos autores han propuesto que el problema de las células T neonatales es estrictamente cuantitativo: los neonatos tendrían menos células T que los adultos [80]. Varios autores han descrito valores de referencia para las subpoblaciones inmunitarias en niños desde el nacimiento (neonatos nacidos a término) hasta la adolescencia [81], aunque son pocos los estudios que han analizado estas poblaciones en neonatos prematuros [82, 83]. La novedad del presente estudio con respecto a lo que existe en la literatura es que no solo se ha analizado el porcentaje de estas poblaciones, sino que también se ha determinado el número absoluto de prácticamente todas las subpoblaciones inmunes relevantes, incluyendo las células Treg.

Nuestros resultados muestran algunas discrepancias entre los porcentajes obtenidos para alguna de las poblaciones y los porcentajes mostrados en otros estudios [82]. Estas diferencias se deben probablemente al bajo número de muestras o de neonatos incluidos en algunos de estos estudios, o a diferencias en los protocolos usados para identificar estas poblaciones. Los resultados obtenidos en cuanto al número absoluto indican que **los neonatos prematuros presentan una marcada leucopenia y linfopenia** que podría ser crucial en la mayor incidencia de infecciones que experimentan. Observamos que los granulocitos, y sobre todo los neutrófilos, estaban muy disminuidos en el grupo de prematuros. La media del recuento de neutrófilos, que se considera una de las principales defensas frente a infecciones, fue 3,8

veces inferior en prematuros que en los neonatos nacidos a término. La **neutropenia** se ha correlacionado con un aumento en la incidencia de sepsis neonatal [84], y un estudio reciente establece una asociación directa entre la neutropenia y la aparición de sepsis temprana y muerte en niños prematuros o de muy bajo peso al nacer [85]. Por tanto, la neutropenia observada en el grupo de prematuros podría constituir uno de los factores responsables de la mayor incidencia de sepsis neonatal en niños prematuros.

En neonatos prematuros, también encontramos valores absolutos disminuidos de células B, NK, TCD4+ y TCD8+. Estas poblaciones son esenciales en las respuestas inmunes innatas y adaptativas, y juegan un papel clave en la coordinación y regulación de las respuestas de otras poblaciones inmunitarias. Se ha descrito que en neonatos que presentan sepsis neonatal e infecciones recurrentes existe una deficiencia en la citotoxicidad de las células NK [86], que podría estar asociada al bajo número que encontramos para esta población. Otra de las poblaciones que apareció disminuida en prematuros son los monocitos, que son cruciales como células presentadoras de antígeno, por lo que su bajo número también contribuiría a una deficiencia en la activación y función de los linfocitos T. Al analizar las proporciones de linfocitos observamos que el porcentaje de linfocitos TCD4+ y TCD8+ es incluso mayor en prematuros. Estos resultados coinciden con lo publicado en varios estudios que muestran porcentajes de linfocitos más altos en neonatos [87] y prematuros [82, 83] que en niños o adultos. Los porcentajes aumentados en estas poblaciones podrían hacer pensar que los neonatos prematuros poseen una capacidad inmunológica similar a la de los nacidos a término. Sin embargo, al analizar los recuentos absolutos observamos que **las distintas poblaciones de linfocitos están muy disminuidas** en el grupo de prematuros. Por tanto, a la vista de nuestros resultados parece probable que los neonatos prematuros van a tener una capacidad inmunológica muy disminuida que les puede hacer más susceptibles a las infecciones.

Una de las posibles explicaciones a los bajos recuentos de linfocitos T que encontramos en prematuros, sería que estos niños presenten una deficiencia en la producción tímica de estas células. Sin embargo, al analizar la función tímica no encontramos diferencias entre los grupos en cuanto al contenido de TRECs, y la proporción de TCD4⁺ RTE y TCD8⁺ RTE fueron comparables en ambos grupos. De hecho, se ha descrito que el timo es funcional desde etapas muy tempranas de la gestación [88]. Por tanto, la función tímica y la producción de nuevas células T sería similar en neonatos prematuros y nacidos a término, y **la deficiencia de linfocitos T observada no sería debida a una menor producción tímica** de estas células.

Otro de los mecanismos que podrían estar detrás de la linfopenia observada es una desregulación de las señales químicas (citoquinas) que participan en la homeostasis de estas células. En el grupo de neonatos prematuros observamos una **deficiencia de IL-7 en plasma** que también ha sido descrita por otros autores en neonatos de bajo peso al nacer [89]. La IL-7 es una citoquina esencial para la supervivencia de linfocitos T, especialmente para aquellas células naïve que acaban de salir del timo (RTEs). De hecho, la proporción de RTEs en neonatos y en cordón umbilical es mucho mayor que en sangre periférica de adultos [73], y muestran una mayor proliferación en respuesta a IL-7 que otros linfocitos T presentes en periferia [72]. También se ha descrito que la supervivencia de los linfocitos inmaduros de cordón umbilical es muy limitada, y su viabilidad es mucho más dependiente de IL-7 que la de células T naïve o memoria en periferia [75]. Además de la concentración más baja de IL-7 en plasma, también observamos que las células de prematuros presentaban una **menor expresión del receptor IL-7R α** para esta citoquina. Observamos que existía una correlación entre la frecuencia de IL-7R α y los valores absolutos de RTEs y de linfocitos T, lo que indica que a menor expresión de IL-7R α menos cantidad de células, probablemente porque la falta del receptor podría limitar su

supervivencia. IL-7R α ha demostrado ser crucial en la diferenciación de linfocitos T, y una deficiencia parcial de este receptor es suficiente para abrogar el desarrollo de células T y causar una inmunodeficiencia combinada severa [71]. Por tanto, los recuentos inferiores en prematuros de linfocitos T, y en especial de RTEs, podrían ser una consecuencia de concentraciones inferiores de IL-7 en plasma y una menor expresión por parte de las células del receptor IL-7R α . La reducción en el número de RTEs comprometería seriamente la generación de un repertorio adecuado de células T capaz de montar una respuesta inmunitaria adecuada frente a los potenciales patógenos, y podría estar relacionado con la menor respuesta a las inmunizaciones descritas en niños prematuros [90]. En condiciones de linfopenia, la IL-7 se ocupa de mantener la proliferación homeostática de los linfocitos T periféricos promoviendo la expansión de células T para compensar la linfopenia [91, 92]. Desconocemos si este mecanismo sería también capaz de compensar la linfopenia observada en neonatos, pero en el caso de prematuros este mecanismo se verá comprometido al presentar valores disminuidos de IL-7 y de IL-7R α .

Otro factor que podría estar implicado en la linfopenia sería el hecho de haber encontrado **valores superiores de células Treg** en los neonatos prematuros. Como se ha comentado previamente, las Treg ejercen un papel regulador sobre las células inmunitarias suprimiendo la proliferación de células T naive, la función efectora de TCD4+ y TCD8+ diferenciadas, y la función de células B, NK, macrófagos y células dendríticas [9]. Estudios recientes demuestran que durante la gestación se produce un aumento en el número de Treg que favorece la **tolerancia materno-fetal** [93]. Mold *et al.* [46] demostraron que una cantidad substancial de células maternas atraviesan la placenta para residir en los ganglios linfáticos fetales, induciendo el desarrollo de células Treg que suprimen la inmunidad fetal frente a las células maternas. Este hecho podría explicar la presencia de valores altos de Treg en neonatos y la

correlación negativa entre la frecuencia de Treg y la edad gestacional. Los valores de Treg estarían aumentados durante la gestación y a medida que se aproxima el final de la misma, estos valores van disminuyendo progresivamente para normalizarse al nacer. De hecho, hemos observado que el porcentaje y los valores absolutos de Treg en neonatos prematuros y nacidos a término son superiores a los valores reportados en la literatura para niños [81] y adultos [94]. La presencia de valores incrementados de Treg en neonatos prematuros podría jugar un papel protector en la tolerancia meterno-fetal, pero podría tener un efecto secundario inhibiendo la supervivencia y la proliferación de linfocitos y otras poblaciones inmunitarias. Además, a diferencia del resto de linfocitos T, las Treg no requieren IL-7 [95] y de hecho no expresan apenas IL-7R α [64]. Por tanto, la baja concentración de IL-7 en prematuros no afectaría a la supervivencia ni a la frecuencia de Treg, a diferencia de las otras poblaciones de linfocitos T.

Nuestros resultados nos permiten concluir que los neonatos prematuros presentan recuentos de las diferentes poblaciones inmunes muy inferiores a los neonatos nacidos a término. Esta leucopenia afecta a todas las subpoblaciones de granulocitos y linfocitos, que son esenciales para el correcto desarrollo de las respuestas inmunológicas. La mayor frecuencia de células Treg, junto con los valores disminuidos de IL-7 plasmática y de su receptor IL-7R α en las células probablemente estén contribuyendo a la leucopenia o linfopenia observada. Además, esta deficiencia no se limitaría al momento del parto, ya que varios estudios de seguimiento en neonatos prematuros muestran que la linfopenia se prolonga hasta 7 meses después del nacimiento [90], lo cual podría estar correlacionado con la alta incidencia de sepsis en estos neonatos prematuros [40].

Históricamente, la detección de inmunodeficiencia en neonatos se guiaba por la presencia o ausencia de ciertos tipos de infección. El identificar neonatos que presenten una marcada deficiencia de linfocitos

antes de que desarrollen las secuelas podría permitir a los clínicos tomar medidas preventivas y reducir la mortalidad drásticamente. Los valores de referencia mostrados en esta Tesis podrían ser de utilidad para los neonatólogos en esta tarea. Terapias como el trasplante de células madre, o tratamientos que han demostrado su eficacia frente a la neutropenia o la inmunodeficiencia combinada severa [96] podrían acelerar el desarrollo inmunitario en aquellos neonatos con mayor deficiencia inmune y reducir en gran medida la mortalidad asociada a infecciones en los neonatos prematuros.

5.2. Disfunción tímica y desregulación inmune en niños con síndrome de DiGeorge

El síndrome de la delección 22q11.2 se asocia con varios grados de linfopenia variando desde una inmunodeficiencia profunda hasta una inmunidad normal. En esta Tesis hemos descrito que, incluso los niños con SDG que no manifiestan ningún signo clínico de desórdenes inmunes, presentan alteraciones y una marcada desregulación de la homeostasis inmunológica. La deficiencia en la función tímica y la consecuente linfopenia podrían alterar el correcto desarrollo inmunitario y comprometer la integridad de la inmunidad en la edad adulta.

Se ha descrito que la mayoría de niños con SDG presentan una hipoplasia tímica, lo cual ha sido confirmado midiendo el volumen tímico y mediante el uso de marcadores de producción tímica [97]. En este estudio observamos que la **producción tímica de nuevas células T** [cuantificada como valores de sj-TREC y β -TREC] es muy inferior en niños con SDG que en controles sanos, lo cual coincide con otros estudios [51, 52, 97]. Cabe destacar que según nuestros resultados, los niños SDG tienen una menor producción total de nuevas células T pero la función tímica en el tejido que conservan parece ser normal [65]. Es decir, los pacientes SDG asintomáticos tendrían menor cantidad de tejido tímico pero el tejido que poseen sería estructuralmente y funcionalmente normal. Este hecho podría constituir una diferencia relevante entre los niños sintomáticos y asintomáticos. En tal escenario, la menor producción tímica sería responsable de los valores de linfocitos T más bajos observados en el grupo SDG, pero estos niños no presentarían alteraciones en otras poblaciones inmunitarias como células B, NK, neutrófilos, monocitos o granulocitos.

El mantenimiento del *pool* de células T en periferia se consigue debido a la renovación de las células T periféricas y a la producción tímica, que proporciona nuevas células al pool de linfocitos T en circulación [31, 33, 98]. La involución tímica asociada a la edad hace que la producción de nuevas células sea menor, y para evitar que disminuya la cantidad total de células existe un mecanismo homeostático que persigue mantener el tamaño de la población de células T naive mediante la expansión periférica de las mismas [75, 99]. En los niños con SDG no encontramos evidencias de un mecanismo compensatorio para la población TCD8+. Los valores absolutos de células TCD8+, sobre todo las de fenotipo naive, fueron muy inferiores a los de niños sanos, pero no hallamos signos de una mayor expansión periférica ni cambios en la proporción de los distintos estados de diferenciación en la población TCD8+ con respecto a controles. Sin embargo, en la población TCD4+ de niños SDG sí observamos evidencias de una **mayor historia proliferativa en la población TCD4+ naive** (reflejada en un menor porcentaje de células CD31+ [68]). Uno de los mecanismos homeostáticos responsables de mantener el *pool* de células naive es el estímulo a través de la IL-7. Las células TCD4+ naive expresan de forma constitutiva el receptor IL-7R α [100], y la IL-7 ha demostrado inducir la proliferación y aumentar la supervivencia de estas TCD4+ naive. Es interesante indicar que, la proliferación inducida por IL-7 en células naive no induce su diferenciación hacia células memoria, con lo cual se asegura la preservación de su fenotipo naive [75]. Acorde con esto, observamos que la mayoría de las células TCD4+ naive de los niños sanos expresaban de forma constitutiva IL-7R α . Sin embargo, en los niños SDG la proporción de células naive que expresaban este receptor era mucho menor. Se ha descrito que una deficiencia parcial de IL-7R α puede ser suficiente para abrogar el desarrollo de las células T [71], lo cual explicaría por qué los niños con SDG no son capaces de recuperar o de mantener el tamaño de la población TCD4+. La **menor expresión de IL-7R α** podría favorecer la proliferación homeostática de las células

TCD4+ naive pero provocando su diferenciación a células memoria, que ha demostrado ser posible sin la necesidad de presentar un antígeno [101, 102]. Además, varios estudios demuestran que la extirpación completa del timo que se practica durante la cirugía para corregir problemas cardiacos [103] produce un envejecimiento prematuro o senescencia del sistema inmunitario. De forma similar, las células **TCD4+ generadas en niños SDG mediante proliferación homeostática** podrían ser más senescentes comprometiendo la supervivencia y la funcionalidad de estas células en la edad adulta. Este hecho fue confirmado por el trabajo de Pilliero *et al.* en el que muestran que los adultos con SDG presentan valores absolutos de células T similares a los de individuos sanos, pero estas células sufren una mayor conversión de fenotipo naive a memoria, tienen telómeros más cortos y presentan un déficit en la variabilidad del repertorio TCR [52].

Como se ha mencionado previamente, las células Treg son clave en la homeostasis inmunológica [5], pero dado que esta población también proviene del timo podría estar alterada en los pacientes con SDG. Efectivamente, nuestros resultados muestran que los niños con SDG presentan recuentos de Treg muy inferiores a los de niños sanos, sobre todo de Treg con fenotipo naive, y la **disminución de Treg** se correlacionaba directamente con la menor producción tímica en estos niños. La disminución de Treg naive no estaría asociada a una menor expresión de IL-7R α ya que las Treg de forma constitutiva tienen una expresión muy baja de este receptor [64], y su supervivencia no depende de IL-7 [95]. Además, en los niños SDG observamos que el balance Treg-naive/Treg-activada estaba invertido en comparación a controles. La cantidad de células Treg está en un estricto equilibrio con la cantidad de células TCD4+ activadas que producen IL-2, con el fin de controlar la expansión de células T durante las respuestas inmunológicas y prevenir por tanto los procesos autoinmunes o linfoproliferativos [104]. Por tanto, el incremento de células TCD4+ activadas debido a la expansión periférica también favorecería la activación de Treg en un intento de

controlar la expansión periférica de estas células T. Este hecho viene confirmado por la correlación encontrada en niños con SDG entre la frecuencia de Treg activadas y de TCD4+ activadas, que sin embargo, no aparece en niños sanos. Se ha descrito un fenómeno similar en pacientes infectados por el VIH con recuentos bajos de CD4, en los que aparecía una mayor proliferación de células Treg y una mayor diferenciación de estas Treg hacia un fenotipo activado o memoria [105]. Varios trabajos indican que las células Treg memoria (CD45RA-) pueden adquirir un fenotipo de célula Th17 expresando ROR γ δ y secretando IL-17 [106-108], y en comparación a las Treg naive, presentan un mayor grado de metilación en el locus Foxp3 que favorece la pérdida de su capacidad supresora [107, 109]. Por tanto es importante indicar que, la prevalencia de un **fenotipo activado o memoria en la población Treg** podría comprometer el papel homeostático de estas células, lo cual podría guardar relación con la mayor incidencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes con SDG. De hecho, Laakso *et al.* han demostrado que en pacientes con *poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica* (APECED) la población Treg naive mostraba un recambio o “*turnover*” acelerado y una mayor diferenciación hacia un fenotipo activado que disminuía la capacidad supresora y el control de la enfermedad autoinmune por parte de las Treg [110].

Por tanto, podemos concluir que los niños con SDG, a pesar de la ausencia de síntomas clínicos, presentan un déficit de linfocitos T y una desregulación homeostática en la población TCD4+. En consecuencia, dado que la expansión periférica de células TCD4+ puede estar favoreciendo su conversión a un fenotipo memoria o activado, que es más susceptible a la apoptosis [111], los valores absolutos de células TCD4+ y el total de linfocitos T estaría reducido en estos niños en comparación con controles sanos. Una consecuencia del intento de recuperar los recuentos de células T a base de una mayor proliferación homeostática sería que el repertorio de especificidades será menos

diverso que si las células hubieran sido generadas en el timo. Además la mayor historia proliferativa en estas células inmunitarias podría conducir las a un envejecimiento prematuro o senescencia que les haría perder su capacidad funcional. La desregulación en la población TCD4+ también favorecería la diferenciación de Treg a un fenotipo memoria/activada que comprometería la capacidad supresora de estas células. El conjunto de todos estos factores podría tener un efecto muy negativo sobre el sistema inmunológico y su homeostasis, y podría ser responsable de la mayor incidencia de infecciones e enfermedades autoinmunes en estos pacientes [49, 53].

5.3. Mecanismos inmunológicos implicados en la inducción de tolerancia en niños alérgicos

En este estudio mostramos que un protocolo **SOTI con dosis crecientes de huevo fue capaz de inducir tolerancia** en la mayoría de niños enrolados en el estudio. Al alcanzar la tolerancia los niños alérgicos experimentaron una marcada **disminución en el porcentaje y número absoluto de células CD4+ Tem**. Estas células Tem tienen una función efectora inmediata y pueden producir rápidamente mediadores inflamatorios como las citoquinas de tipo Th2 IL-4 e IL-5 [112], jugando un papel clave en alergias alimentarias [113]. Por tanto, el descenso en la frecuencia de Tem podría constituir un signo de la desensibilización al alérgeno. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde se observa un descenso de células CD4+ Tem en un modelo murino de tolerancia oral a OVA [114].

Por otro lado, en todos los niños que alcanzaron la tolerancia observamos un marcado **incremento en el número absoluto de una subpoblación definida como CD38/ROneg**. La molécula CD38 ha sido considerada como un marcador de activación en células TCD4+ humanas, y el aumento de la población CD4+HLA-DR+CD38+ se ha asociado a una mayor hiperactivación inmune [115]. Sin embargo, la población que hemos hallado asociada a la tolerancia era negativa para los marcadores CD45RO y HLA-DR. Scalzo-Inguanti *et al.* [116] han descrito recientemente una nueva subpoblación de linfocitos T que no se ajusta a los paradigmas de un fenotipo naive ni memoria, y que correspondería a esta población CD38/ROneg que encontramos en nuestro estudio. Estas células son hipo-proliferativas y no adquieren una capacidad efectora completa tras la estimulación a través del TCR, permaneciendo en un estado “estático”. Adicionalmente, estas células

CD38+ han mostrado una tendencia a secretar IL-13, pero no otras citoquinas Th2 como la IL-4 o IL5 [116]. ¿Cuál sería el origen de estas células? El incremento observado en el número absoluto de RTEs tras SOTI (consideradas un marcador de producción tímica [68]), y la correlación positiva entre los recuentos de células CD38/ROneg y de TCD4+ RTEs apuntan a una probable generación *de novo* de estas células por parte del timo. Por tanto, proponemos que la terapia SOTI induce cambios en la homeostasis inmune que aumenta la renovación de la población TCD4+ por el timo, cuya función estaría preservada en niños. En la presencia de los antígenos del huevo, las nuevas células T experimentarían la selección negativa que se da en el timo y que asegura la selección de clones “no-reactivos”, adquiriendo este nuevo fenotipo “no-reactivo” y reduciendo las respuestas inmunológicas frente al alérgeno.

La **aparición de un fenotipo hipo-proliferativo** podría estar relacionada con la adquisición de tolerancia dado el carácter “estático” o no-reactivo de estas células. De hecho, observamos que la frecuencia y valores absolutos de células CD38/ROneg en niños alérgicos (TO) era muy inferior al encontrado en el grupo de controles sanos. Sin embargo, después de SOTI estos valores se normalizaron alcanzando niveles comparables a los de controles, lo que apunta a una posible asociación entre la presencia de este fenotipo no-reactivo y la tolerancia al alérgeno. Como se menciona en el apartado 4.3.2 de resultados, los 3 niños que no alcanzaron una tolerancia completa mostraron una reducción tanto en la proporción como en el recuento de CD38/ROneg entre TO y la última muestra obtenida, lo que indica que esta población podría constituir un marcador fiable de desensibilización. Sin embargo, el alto grado de éxito con estas terapias hace que no tengamos datos en un suficiente número de pacientes no desensibilizados para sacar conclusiones definitivas. Serían necesarios otros estudios en grandes cohortes de niños incluyendo grupos placebo, para determinar si la ausencia de una recuperación de CD38/ROneg constituye un marcador predictivo de pacientes en los que la terapia SOTI no conseguirá la

desensibilización. También observamos que los niños alérgicos presentaban un mayor porcentaje y número absoluto de células Tem que los controles, y después de SOTI estos valores volvieron a niveles comparables a los observados en niños no alérgicos, lo cual podría estar asociado con una disminución de las respuestas alérgicas.

Uno de los mecanismos que podría estar detrás de la disminución de las células efectoras es la capacidad supresora de las Treg. Estudios tanto en humanos como en modelos animales demuestran que los procesos alérgicos se deben a una respuesta inmunológica aberrante mediada por células TCD4+ de tipo Th2, y las Treg han demostrado ser cruciales en el control de las repuestas alérgicas al suprimir las células T efectoras alérgeno-específicas [61]. Los resultados muestran que la tolerancia alcanzada tras SOTI se acompaña de un **aumento en la frecuencia y cantidad de Treg**. Coincidiendo con estos resultados, existen trabajos que indican que la inmunoterapia con aero-alérgenos o venenos se asociaba con la inducción de tolerancia periférica en las células T debido a la generación de Treg que secretaban citoquinas supresoras como IL-10 y TGF- β [61]. Se sabe poco sobre cómo se generan exactamente estas Treg. Las células Treg se generan normalmente en el timo pero también pueden ser inducidas en periferia mediante la diferenciación de células T convencionales (llamándose iTreg) [79]. En este estudio se observa un ligero aumento en el número de Treg naive y por tanto, no se puede excluir que un aumento en la producción tímica sea el origen de las Treg generadas. Sin embargo, el aumento de Treg fue más marcado en la población de Treg efectoras, lo cual apunta a una inducción periférica de Treg a partir de Treg naive, o incluso de TCD4+ naive que no son Treg mediado por una presentación antigénica subinmunogénica [79]. De hecho, estudios en modelos murinos muestran que la administración de ovoalbúmina oralmente inducía la generación de células iTreg OVA-específicas sin generar células T efectoras [117]. Por tanto SOTI podría favorecer la generación de iTreg

antígeno-específicas sin un aumento concomitante de la diferenciación o activación de células TCD4+ efectoras.

Como se indica en resultados, se ha descrito que la respuesta inmune frente a alérgenos en individuos sanos o alérgicos es el resultado del equilibrio entre Treg y células T efectoras, y un cambio en la población dominante puede conducir al desarrollo de alergias o bien a la adquisición de tolerancia [61]. La adquisición de tolerancia tras SOTI se asoció con un aumento significativo del ratio Treg/Tem hasta valores comparables a los de niños no alérgicos. Además, se observó que este aumento de Treg y bajada de Tem también se correlacionó con una disminución en la cantidad de basófilos, que es otra de las células efectoras implicadas en los procesos alérgicos. Las correlaciones encontradas entre el aumento de Treg y la disminución de células efectoras indican que las **Treg podrían ser responsables de la disminución de las respuestas alérgicas y de la desaparición de los síntomas** en niños desensibilizados. Este hecho estaría apoyado por estudios que demuestran que la depleción de células Treg previa a un cultivo *in vitro* aumenta de forma marcada la expansión de células T efectoras antígeno-específicas provenientes de niños alérgicos [118].

Por último, otros factores implicados en los procesos alérgicos, y que se relacionan estrechamente con la presencia de células efectoras, son los **niveles de citoquinas en plasma y de moléculas IgE e IgG específicas**. La adquisición de tolerancia se acompaña frecuentemente de una disminución en los niveles de IgE específicas y un aumento de IgG4 [57, 58]. Las células CD38/ROneg, que recuperan sus valores con SOTI, han mostrado ser la principal fuente de IL-13 en experimentos *in vitro* [116], y se sabe que la IL-13 induce la producción de IgG4 y el cambio de isotipo de IgE en células B [119]. En este estudio no hemos medido valores de IgG4 específicas, pero sí observamos un aumento significativo de IgG total frente a la clara de huevo entre TO y Tend. Además, encontramos una correlación directa entre los valores de esta

IgG frente a clara y el número absoluto de células CD38/ROneg, que podría deberse a la producción de IL-13 descrita en esta población [116]. De hecho, la IL-13 fue la única citoquina que mostraba una tendencia a estar incrementada al finalizar SOTI, mientras que la mayoría de las otras citoquinas analizadas mostraron una reducción. La menor cantidad en plasma de estas citoquinas podría estar relacionada con la reducción en la cantidad de células Tem que serían reemplazadas por células con fenotipo CD38/ROneg, que han mostrado tener una capacidad reducida de producir IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-5 [116]. La reducción en la presencia de citoquinas como la IL-10 e IL-5, que son cruciales en las alergias alimentarias [113, 120], y de otras citoquinas implicadas en las respuestas alérgicas [121] estarían contribuyendo a la desaparición de síntomas y a la adquisición de tolerancia. El protocolo de desensibilización probablemente induce cambios principalmente en las células inmunes antígeno-específicas, que serían responsables de la desaparición de las respuestas inmunológicas adversas frente al alérgeno en cuestión. La frecuencia de estas células alérgeno-específicas en sangre es de 0,05-0,005%, por tanto los cambios observados en las subpoblaciones totales de linfocitos y en los niveles de citoquinas o inmunoglobulinas no pueden deberse únicamente a diferencias en las poblaciones antígeno-específicas. Por ello, pensamos que SOTI también puede inducir cambios en la homeostasis inmunológica o en los niveles de citoquinas haciendo que los cambios también se reflejen en la población total de linfocitos presentes en sangre periférica.

Podemos concluir que el protocolo SOTI consigue inducir la tolerancia en niños alérgicos. En estos niños se observa un reemplazo de las células Tem por una población de células CD38/ROneg hipoproliferativa que podría reflejar una reducción de las respuestas alérgicas y constituir un marcador de desensibilización. Pensamos que la prevalencia de esta población CD38/ROneg podría estar implicada en la tolerancia a alérgenos en los niños sanos, ya que los niños alérgicos presentaron valores muy inferiores. Entre los mecanismos que podrían

ser responsables de la disminución de células efectoras y la desaparición de síntomas, pensamos que las células Treg son cruciales en este proceso. La inducción de tolerancia tras SOTI se asoció a un incremento de células Treg que participarían en el control de las células efectoras y la consiguiente reducción de síntomas. Los hallazgos de este estudio contribuyen a un mejor entendimiento de los mecanismos inmunológicos que están detrás de los procesos alérgicos; y las poblaciones identificadas, fácilmente cuantificables en sangre periférica, pueden ser de utilidad como marcadores predictivos de tolerancia y en el seguimiento clínico de pacientes alérgicos.

A modo de resumen, los resultados obtenidos en esta Tesis indican que la población de células Treg se constituye precozmente durante la gestación, ya que juegan un papel clave en la tolerancia-materno fetal. Sus valores van disminuyendo al final de la gestación, pero los valores aumentados presentes en neonatos prematuros podrían contribuir a la marcada leucopenia y linfopenia observada en estos niños, y que es probablemente responsable de la alta incidencia de infecciones en estos neonatos. Una disfunción tímica, como la que se ve en niños con SDG, conlleva una marcada caída en la cantidad de Treg, que puede comprometer el papel homeostático de estas células y favorecer la aparición de procesos autoinmunes. Por último, los datos demuestran el papel clave que juegan estas células en la tolerancia y procesos alérgicos. La desensibilización mediante inmunoterapia oral en niños alérgicos se relacionó con un marcado aumento de Treg, que se correlacionó con una caída de las células efectoras implicadas en los procesos alérgicos y probablemente contribuya a la desaparición de los síntomas de la alergia.

Con todo ello, podemos concluir que la población Treg juega un papel clave en la homeostasis inmunológica durante la infancia. La deficiencia de Treg puede conllevar alteraciones en la homeostasis que podrían

desencadenar procesos patológicos como las enfermedades autoinmunes. Mientras que la respuesta adecuada de estas células puede contribuir a resolver otras patologías como las alergias alimentarias. Estos hallazgos abren una nueva ventana al uso de terapias potenciadoras de la población Treg para resolver patologías como la alergia, enfermedades autoinmune o rechazo a trasplantes en niños.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- 1) Los neonatos prematuros presentan una marcada leucopenia y linfopenia que podría deberse a una deficiencia de IL-7 y a una menor expresión de su receptor por parte de las células. Esta inmunodeficiencia podría ser responsable de la alta incidencia de infecciones en estos niños.
- 2) Las células Treg juegan un papel clave durante la gestación en la tolerancia materno-fetal, y sus valores están aumentados en prematuros. Dado su efecto supresor, los valores aumentados de esta población también podrían contribuir a la leucopenia y linfopenias observadas en estos niños.
- 3) La disfunción tímica presente en niños con síndrome de DiGeorge es responsable de una marcada deficiencia de linfocitos T y también de células Treg. Los mecanismos homeostáticos que intentan recuperar esta población conducen a una diferenciación de células TCD4⁺ naïve y de células Treg naïve, que podrían favorecer el envejecimiento del sistema inmune y una pérdida parcial de su capacidad funcional.
- 4) La inmunoterapia oral en niños alérgicos al huevo consigue inducir tolerancia. La desensibilización se asoció a una caída de células TCD4⁺ efectoras y a la recuperación de una nueva subpoblación de células TCD4⁺ con un fenotipo hipo-proliferativo o estático.
- 5) La inducción de tolerancia en niños alérgicos también se asoció con un marcado aumento de células Treg que podrían ser responsables del control de células efectoras, y que conduciría a la desaparición de los síntomas.

Conclusions

- 1) Preterm neonates show a marked leukopenia and lymphopenia, which could be due to a deficiency of IL-7 and the impaired expression of its receptor in T cells. This immunodeficiency could be responsible of the high incidence of infections in these newborns.
- 2) Treg cells play a crucial role during pregnancy maintaining the maternal-foetal tolerance, and their values are increased in preterm infants. Due to the suppressive capacity of these cells, the increased values of Treg could also contribute to the leukopenia and lymphopenia observed in these neonates.
- 3) The thymic impairment present in children with DiGeorge syndrome is responsible of a marked T-cell deficiency that also affects to Treg cells. The homeostatic mechanisms that try to recover the T-cell population leads to the differentiation of naïve CD4+ T cells and naïve Treg cells, which could favours the premature ageing of the immune system and a partial loss of its functional capacity.
- 4) The oral immunotherapy in egg allergic children induces the tolerance to the antigen. The desensitization was related to a drop of effector CD4+ T cells and the recovery of a new subset of CD4+ t cells with a hypo-proliferative or static phenotype.
- 5) The tolerance induction in allergic children was also related with a marked increase of Treg cells that could be responsible of the control of effector T cells, which would lead to the disappearance of symptoms.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- 1 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª Edición edn: Elsevier Saunders 2008.
- 2 Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Inmunología*. 5ª edn: Ed. Harcourt 2000.
- 3 Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. ***Science***. 1969; 166: 753-5.
- 4 Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. ***Eur J Immunol***. 2007; 37 Suppl 1: S116-23.
- 5 Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. ***Cell***. 2008; 133: 775-87.
- 6 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. ***Nat Immunol***. 2003; 4: 330-6.
- 7 Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. ***Immunity***. 2005; 22: 329-41.
- 8 Wing K, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. ***Scand J Immunol***. 2005; 62: 1-15.
- 9 Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. ***Nat Immunol***. 2008; 9: 239-44.
- 10 von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. ***Nat Immunol***. 2005; 6: 338-44.
- 11 Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. ***Nat Rev Immunol***. 2008; 8: 523-32.
- 12 Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. ***J Autoimmun***. 2003; 21: 273-6.
- 13 Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. ***J Clin Invest***. 2002; 109: 131-40.
- 14 de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. ***J Immunol***. 2004; 172: 6435-43.
- 15 Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. ***Nat Genet***. 2001; 27: 20-1.

- 16 Halabi-Tawil M, Ruemmele FM, Fraitag S, Rieux-Laucat F, Neven B, Brousse N, De Prost Y, Fischer A, Goulet O, Bodemer C. Cutaneous manifestations of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome. **Br J Dermatol.** 2009; 160: 645-51.
- 17 Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. **Curr Opin Immunol.** 2003; 15: 627-33.
- 18 Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. **Lancet.** 2004; 363: 608-15.
- 19 Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Tsuda M, Ikegami T, Kibe A, Yoshiura Y, Komori M, Hamasaki N, Aizawa H, Nakanishi Y. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. **Int Arch Allergy Immunol.** 2004; 134: 295-302.
- 20 Alvarez CM, Opelz G, Garcia LF, Susal C. Expression of regulatory T-cell-related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients. **Transplantation.** 2009; 87: 857-63.
- 21 Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, Benedict Cosimi A, Colvin RB. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. **Am J Transplant.** 2007; 7: 914-22.
- 22 Wu J, Yi S, Ouyang L, Jimenez E, Simond D, Wang W, Wang Y, Hawthorne WJ, O'Connell PJ. In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells are potent suppressors of T-cell-mediated xenogeneic responses. **Transplantation.** 2008; 85: 1841-8.
- 23 Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. **J Immunol.** 2002; 169: 2756-61.
- 24 Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. **J Immunol.** 1999; 163: 5211-8.
- 25 Rouse BT, Suvas S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire. **J Immunol.** 2004; 173: 2211-5.
- 26 Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature.** 2002; 420: 502-7.
- 27 Kinter A, McNally J, Riggan L, Jackson R, Roby G, Fauci AS. Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2007; 104: 3390-5.
- 28 Fujimaki W, Takahashi N, Ohnuma K, Nagatsu M, Kurosawa H, Yoshida S, Dang NH, Uchiyama T, Morimoto C. Comparative study of regulatory T cell function of human CD25CD4 T cells from

- thymocytes, cord blood, and adult peripheral blood. *Clin Dev Immunol*. 2008; 2008: 305859.
- 29 Kivling A, Nilsson L, Falth-Magnusson K, Sollvander S, Johanson C, Faresjo M. Diverse foxp3 expression in children with type 1 diabetes and celiac disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1150: 273-7.
 - 30 Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)CD25(+)CD127(lo/-) regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 1460-6, 66 e1-7.
 - 31 Correa R, Munoz-Fernandez A. Effects of highly active antiretroviral therapy on thymical reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected children. *AIDS*. 2002; 16: 1181-3.
 - 32 Correa R, Munoz-Fernandez MA. Viral phenotype affects the thymic production of new T cells in HIV-1-infected children. *AIDS*. 2001; 15: 1959-63.
 - 33 Correa R, Munoz-Fernandez MA. Production of new T cells by thymus in children: effect of HIV infection and antiretroviral therapy. *Pediatr Res*. 2002; 52: 207-12.
 - 34 Correa R, Muñoz-Fernández MA. Reconstitución inmunológica en la infección pediátrica por VIH-1. *Acta Pediátrica Esp*. 2000; 58: 726-33.
 - 35 Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998; 396: 690-5.
 - 36 Mackall CL, Gress RE. Thymic aging and T-cell regeneration. *Immunol Rev*. 1997; 160: 91-102.
 - 37 Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol*. 1986; 75: 43-88.
 - 38 Iams JD, Romero R, Culhane JF, Goldenberg RL. Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *Lancet*. 2008; 371: 164-75.
 - 39 Shankaran S, Fanaroff AA, Wright LL, Stevenson DK, Donovan EF, Ehrenkranz RA, Langer JC, Korones SB, Stoll BJ, Tyson JE, Bauer CR, Lemons JA, Oh W, Papile LA. Risk factors for early death among extremely low-birth-weight infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 186: 796-802.
 - 40 Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, Hale EC, Newman NS, Schibler K, Carlo WA, Kennedy KA, Poindexter BB, Finer NN, Ehrenkranz RA, Duara S, Sanchez PJ, O'Shea TM, Goldberg RN, Van Meurs KP, Faix RG, Phelps DL, Frantz ID, 3rd, Watterberg KL, Saha S, Das A, Higgins RD. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010; 126: 443-56.
 - 41 Zeitlin J, El Ayoubi M, Jarreau PH, Draper ES, Blondel B, Kunzel W, Cuttini M, Kaminski M, Gortner L, Van Reempts P, Kollee L, Papiernik E. Impact of fetal growth restriction on mortality and

- morbidity in a very preterm birth cohort. **J Pediatr.** 2010; 157: 733-9 e1.
- 42 Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannel I, Hulstaert F, Hamilton C, Mackinnon H, Stokes LT, Munhyeshuli V, Vanlangendonck F, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. **J Pediatr.** 1992; 120: 216-22.
- 43 Gans HA, Arvin AM, Galinus J, Logan L, DeHovitz R, Maldonado Y. Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. **JAMA.** 1998; 280: 527-32.
- 44 Lewis D, Wilson C. Developmental immunology and role of host defences in neonatal susceptibility to infection. In: J Remington and J Klein E (ed.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia.: Saunders, Philadelphia. 1995; 20-98.
- 45 Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clin Exp Immunol.** 2004; 136: 373-8.
- 46 Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, Lee TH, Nixon DF, McCune JM. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. **Science.** 2008; 322: 1562-5.
- 47 Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. **Lancet.** 2007; 370: 1443-52.
- 48 Perez E, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome [DiGeorge and velocardiofacial syndromes]. **Curr Opin Pediatr.** 2002; 14: 678-83.
- 49 Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Lack of correlation between impaired T cell production, immunodeficiency, and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion syndromes. **Clin Immunol Immunopathol.** 1998; 86: 141-6.
- 50 Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brondum-Nielsen K, Scambler PJ, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. **J Med Genet.** 1997; 34: 798-804.
- 51 Eberle P, Berger C, Junge S, Dougoud S, Buchel EV, Riegel M, Schinzel A, Seger R, Gungor T. Persistent low thymic activity and non-cardiac mortality in children with chromosome 22q11.2 microdeletion and partial DiGeorge syndrome. **Clin Exp Immunol.** 2009; 155: 189-98.
- 52 Piliero LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. **Blood.** 2004; 103: 1020-5.

- 53 Tison BE, Nicholas SK, Abramson SL, Hanson IC, Paul ME, Seeborg FO, Shearer WT, Perez MD, Noroski LM, Chinen J. Autoimmunity in a cohort of 130 pediatric patients with partial DiGeorge syndrome. **J Allergy Clin Immunol.** 2011; 128: 1115-7 e1-3.
- 54 Cvetanovich GL, Hafler DA. Human regulatory T cells in autoimmune diseases. **Curr Opin Immunol.** 2010; 22: 753-60.
- 55 Koplin JJ, Martin PE, Allen KJ. An update on epidemiology of anaphylaxis in children and adults. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** 2011; 11: 492-6.
- 56 Prescott S, Allen KJ. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. **Pediatr Allergy Immunol.** 2011; 22: 155-60.
- 57 Garcia Rodriguez R, Urra JM, Feo-Brito F, Galindo PA, Borja J, Gomez E, Lara P, Guerra F. Oral rush desensitization to egg: efficacy and safety. **Clin Exp Allergy.** 2011; 41: 1289-96.
- 58 Lemon-Mule H, Sampson HA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Nowak-Wegrzyn A. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. **J Allergy Clin Immunol.** 2008; 122: 977-83 e1.
- 59 Adel-Patient K, Wavrin S, Bernard H, Meziti N, Ah-Leung S, Wal JM. Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine beta-lactoglobulin. **Allergy.** 2011; 66: 1312-21.
- 60 Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. **J Allergy Clin Immunol.** 2009; 123: 735-46; quiz 47-8.
- 61 Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. **J Exp Med.** 2004; 199: 1567-75.
- 62 Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R, Edinger M. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. **Eur J Immunol.** 2009; 39: 1088-97.
- 63 Garcia-Merino I, de Las Cuevas N, Jimenez JL, Garcia A, Gallego J, Gomez C, Garcia D, Munoz-Fernandez MA. Pediatric HIV BioBank: a new role of the Spanish HIV BioBank in pediatric HIV research. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2010; 26: 241-4.
- 64 Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **J Exp Med.** 2006; 203: 1701-11.
- 65 Ferrando-Martinez S, Franco JM, Ruiz-Mateos E, Hernandez A, Ordonez A, Gutierrez E, Leal M. A reliable and simplified sj/beta-TREC ratio quantification method for human thymic output measurement. **J Immunol Methods.** 2010; 352: 111-7.

- 66 Haines CJ, Giffon TD, Lu LS, Lu X, Tessier-Lavigne M, Ross DT, Lewis DB. Human CD4+ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. *J Exp Med*. 2009; 206: 275-85.
- 67 Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A, Thiel A. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med*. 2002; 195: 789-94.
- 68 Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*. 2009; 113: 769-74.
- 69 Malin GL, Morris RK, Khan KS. Strength of association between umbilical cord pH and perinatal and long term outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010; 340: c1471.
- 70 Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest*. 2005; 115: 1953-62.
- 71 Roifman CM, Zhang J, Chitayat D, Sharfe N. A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency. *Blood*. 2000; 96: 2803-7.
- 72 Swainson L, Kinet S, Mongellaz C, Sourisseau M, Henriques T, Taylor N. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood*. 2007; 109: 1034-42.
- 73 Hassan J, Reen DJ. Human recent thymic emigrants—identification, expansion, and survival characteristics. *J Immunol*. 2001; 167: 1970-6.
- 74 Dion ML, Sekaly RP, Cheynier R. Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles. *Methods Mol Biol*. 2007; 380: 197-213.
- 75 Soares MV, Borthwick NJ, Maini MK, Janossy G, Salmon M, Akbar AN. IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA+ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J Immunol*. 1998; 161: 5909-17.
- 76 Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Muller W, Sparwasser T, Forster R, Pabst O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*. 2011; 34: 237-46.
- 77 Schouten B, van Esch BC, Hofman GA, de Kivit S, Boon L, Knippels LM, Garssen J, Willemsen LE. A potential role for CD25+ regulatory T-cells in the protection against casein allergy by dietary non-digestible carbohydrates. *Br J Nutr*. 2012; 107: 96-105.
- 78 Yamashita H, Takahashi K, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy*. 2012; 67: 201-9.
- 79 Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003; 198: 1875-86.

- 80 Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today*. 1999; 20: 330-5.
- 81 van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, Sanders EA, Borghans JA, Wulffraat NM, Bierings MB, Bloem AC, Tesselaar K. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol*. 2009; 133: 95-107.
- 82 Peoples JD, Cheung S, Nesin M, Lin H, Tatad AM, Hoang D, Perlman JM, Cunningham-Rundles S. Neonatal cord blood subsets and cytokine response to bacterial antigens. *Am J Perinatol*. 2009; 26: 647-57.
- 83 Zhao Y, Dai ZP, Lv P, Gao XM. Phenotypic and functional analysis of human T lymphocytes in early second- and third-trimester fetuses. *Clin Exp Immunol*. 2002; 129: 302-8.
- 84 Manzoni P, Rizzollo S, Mostert M, Farina D. Preeclampsia, neutropenia, and risk of fungal sepsis in preterm very low birth weight infants. *J Pediatr*. 2011; 158: 173-4; author reply 74.
- 85 Procianoy RS, Silveira RC, Mussi-Pinhata MM, Souza Rugolo LM, Leone CR, de Andrade Lopes JM, de Almeida MF. Sepsis and neutropenia in very low birth weight infants delivered of mothers with preeclampsia. *J Pediatr*. 2010; 157: 434-8, 38 e1.
- 86 Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovacs A, Kovacs L, Laszlo A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr*. 2001; 160: 478-82.
- 87 Tsegaye A, Wolday D, Otto S, Petros B, Assefa T, Alebachew T, Hailu E, Adugna F, Measho W, Dorigo W, Fontanet AL, van Baarle D, Miedema F. Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians. *Clin Immunol*. 2003; 109: 338-46.
- 88 Rodewald HR. Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 355-88.
- 89 Raqib R, Alam DS, Sarker P, Ahmad SM, Ara G, Yunus M, Moore SE, Fuchs G. Low birth weight is associated with altered immune function in rural Bangladeshi children: a birth cohort study. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85: 845-52.
- 90 Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 2005; 140: 289-92.
- 91 Correa R, Resino S, Munoz-Fernandez MA. Increased interleukin-7 plasma levels are associated with recovery of CD4+ T cells in HIV-infected children. *J Clin Immunol*. 2003; 23: 401-6.
- 92 Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001; 97: 1491-7.

- 93 Kahn DA, Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010; 107: 9299-304.
- 94 Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, Hussaini A, Simms R, Cruikshank WW, Lafyatis R. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. **PLoS One**. 2009; 4: e5981.
- 95 Mazzucchelli R, Hixon JA, Spolski R, Chen X, Li WQ, Hall VL, Willette-Brown J, Hurwitz AA, Leonard WJ, Durum SK. Development of regulatory T cells requires IL-7Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. **Blood**. 2008; 112: 3283-92.
- 96 Myers LA, Patel DD, Puck JM, Buckley RH. Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival. **Blood**. 2002; 99: 872-8.
- 97 Lima K, Abrahamsen TG, Foelling I, Natvig S, Ryder LP, Olausson RW. Low thymic output in the 22q11.2 deletion syndrome measured by CCR9+CD45RA+ T cell counts and T cell receptor rearrangement excision circles. **Clin Exp Immunol**. 2010; 161: 98-107.
- 98 Fink PJ, Hendricks DW. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. **Nat Rev Immunol**. 2011; 11: 544-9.
- 99 Almeida AR, Borghans JA, Freitas AA. T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. **J Exp Med**. 2001; 194: 591-9.
- 100 Webb LM, Foxwell BM, Feldmann M. Interleukin-7 activates human naive CD4+ cells and primes for interleukin-4 production. **Eur J Immunol**. 1997; 27: 633-40.
- 101 Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. **J Exp Med**. 2000; 192: 557-64.
- 102 Su LF, Kidd BA, Han A, Kotzin JJ, Davis MM. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. **Immunity**. 2013; 38: 373-83.
- 103 Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstien B, Ferrand C, Debre P, Sidi D, Appay V. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. **J Clin Invest**. 2009; 119: 3070-8.
- 104 Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. **J Immunol**. 2006; 177: 192-200.
- 105 Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, Oka S. High frequency and proliferation of CD4+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts. **Eur J Immunol**. 2009; 39: 301-9.

- 106 Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, Valmori D. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009; 106: 8635-40.
- 107 Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. **Immunity**. 2009; 30: 899-911.
- 108 Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. **Immunity**. 2008; 29: 44-56.
- 109 Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grutzkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Turbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. **Eur J Immunol**. 2007; 37: 2378-89.
- 110 Laakso SM, Laurinoli TT, Rossi LH, Lehtoviita A, Sairanen H, Perheentupa J, Kekalainen E, Arstila TP. Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3(+) precursors and impaired activated population. **J Autoimmun**. 2010; 35: 351-7.
- 111 Boise LH, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995; 92: 5491-5.
- 112 Sallusto F, Lanzavecchia A. Exploring pathways for memory T cell generation. **J Clin Invest**. 2001; 108: 805-6.
- 113 Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzeel-Koomen CA, Garssen J, Knol EF, Van Hoffen E. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. **J Allergy Clin Immunol**. 2004; 113: 932-9.
- 114 Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J Clin Invest**. 2005; 115: 1923-33.
- 115 Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, Gripshover B, Salata RA, Taege A, Lisgaris M, McComsey GA, Kirchner E, Baum J, Shive C, Asaad R, Kalayjian RC, Sieg SF, Rodriguez B. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. **J Infect Dis**. 2011; 204: 1217-26.
- 116 Scalzo-Inguanti K, Plebanski M. CD38 identifies a hypo-proliferative IL-13-secreting CD4+ T-cell subset that does not fit into existing naive and memory phenotype paradigms. **Eur J Immunol**. 2011; 41: 1298-308.

- 117 Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? ***Immunity***. 2009; 30: 626-35.
- 118 Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. ***J Allergy Clin Immunol***. 2009; 123: 43-52 e7.
- 119 Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 1993; 90: 3730-4.
- 120 Koike Y, Takahashi N, Yada Y, Kawamata R, Sato Y, Momoi MY. Selectively high level of serum interleukin 5 in a newborn infant with cow's milk allergy. ***Pediatrics***. 2011; 127: e231-4.
- 121 Broide DH, Finkelman F, Bochner BS, Rothenberg ME. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. ***J Allergy Clin Immunol***. 2011; 127: 689-95.

8. AGRADECIMIENTOS

8. Agradecimientos

— ¿Otra Tesis? Tú estás mal de la cabeza..... — ya, quizás tienes razón

Soy consciente de que esta Tesis no va a cambiar mi vida profesional, pero el adquirir **conocimientos** siempre ha sido para mí una de las recompensas más gratificantes. Me apasionó estudiar Biología y entender los mecanismos y los engranajes que hacen girar la vida, y hace años descubrí lo fascinante de entender y manipular esos mecanismos para entender mejor las enfermedades y ponerles remedio. El ejercicio de dar forma a esta Tesis, de contextualizar los hallazgos en patologías concretas, y de reflexionar sobre cómo esos hallazgos podrían beneficiar a un niño enfermo ha sido realmente enriquecedor.

Sin intención alguna de restarles importancia, he querido dejar los agradecimientos para el final. Exponiendo primero todo el trabajo que se ha hecho, reflejando la participación imprescindible de pediatras y colaboradores y, tras ver el resultado obtenido, agradecer a todos los que lo han hecho posible. En primer lugar a las **Directoras** de mi Tesis, M^a Ángeles y Maribel.

No es fácil expresar en pocas palabras todo lo que debo agradecerle a “la jefa”, la Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández. Ella ha sido mi mentora y la que ha hecho posible mi carrera científica. Lleva 16 años formándome y enseñándome a ser estudiante, investigador, comunicador, IP, jefe, diplomático, político..... Ha puesto a mi disposición los recursos disponibles y a veces también los que no estaban disponibles para que pudiera desarrollar mi carrera y llegar hasta aquí, abriéndome todas las puertas de manera incondicional. Siempre serás un gran referente para mí y estaré a tu disposición en todo lo que necesites para compensar la gran deuda que tengo contigo.

A la Dra. M^a Isabel de José Gómez por el excelente trabajo que lleva años realizando con los niños infectados por VIH y que ha mejorado radicalmente sus vidas. Por todas las facilidades que nos has dado en innumerables proyectos y colaboraciones y por aceptar co-dirigir esta Tesis. Es un regalo contar con tu apoyo y te deseo ánimo y mucha fuerza!! en la lucha que estás librando.

Al tutor de esta Tesis, el Profesor Jesús Argente, por su ayuda y las facilidades que me ha dado en todo el proceso para llevar a buen término esta Tesis un poco fuera de lo habitual.

Gracias a los demás mentores que he tenido a lo largo de mi carrera, de los que tanto he aprendido y que han sabido inculcarme la pasión por la ciencia y por buscar la perfección en el laboratorio: Dra. Mónica de la Fuente, Dra. Mónica del Río, Profesor Giuseppe Pantaleo y Profesor Vincent Piguet.

Gracias a la Dra. Dolores Gurbindo por su ayuda inestimable en la realización de “todas” mis Tesis, y en tantos otros proyectos a lo largo de todos estos años. Y gracias por tu disponibilidad cada vez que necesitamos ayuda, y por haber sido la pediatra particular de este “niño grande”.

Gracias a las enfermeras y pediatras que han contribuido a la realización de esta Tesis: Dras. Elena Alonso, Victoria Fuentes, Lidia Zapatero, Sonsóles Infante, Elena Seoane, y los demás miembros de la **Sección de Alergia Pediátrica** con los que se ha establecido una colaboración excelente que espero perdure en el tiempo. Y no puedo olvidarme de los niños (y de sus padres) que han participado en el estudio, aceptando ese pequeño pinchacito que tanto pánico les da y que tanta información nos aporta.

En los últimos años he contado además con el apoyo de un excelente grupo, con el que además de realizar colaboraciones científicas se ha establecido una gran amistad y afecto. Gracias al Dr. Manuel Leal y a su grupo del **IBiS de Sevilla**: Yolanda Pacheco, Sara Ferrando, Ezequiel Ruiz-Mateos, Gema Méndez, etc.

Y llega el momento de dar las gracias a la gente con la que más tiempo comparto y que me sufren durante horas todos los días, la gran familia del **Laboratorio de Inmunobiología Molecular**. Gracias a los “antiguos” miembros, que tras 6 años fuera me han acogido de nuevo sin reparos. Al haber crecido juntos es inevitable cogeros un gran cariño: Susana, Laura, y Lola, sabéis que os quiero un montón y a José Luis.... quedaría raro decir que te quiero ;-), pero sabes que te aprecio mucho y te agradezco tu disponibilidad siempre para ayudarnos en mil cosas. Y a los “nuevos” miembros: Chusa, Maribel, Verónica, Irene L, Talía, Santi, Miguel, Sandra, la gente del Biobanco (Isabel, Irene C, Coral,

Almudena, Jorge], y la “savia nueva” Marta, Judith, Quique, Javi, Dani, Pilar y los estudiantes de Master, que han dado “vidilla” al grupo y han contribuido a crear un buen ambiente en el labo. Gracias a Raquel Lorente, que ha jugado un papel clave en esta Tesis y me ha ayudado muchísimo con el procesamiento de muestras, realizando un excelente trabajo y siempre con una sonrisa. Y gracias a Didiana, mi estudiante de Tesis. Ha sido una buena experiencia trabajar contigo, y aunque han surgido dificultades al final, estoy seguro de que tendrás una Tesis excelente. Espero que lo que has aprendido te sea de utilidad en tu carrera.

Quiero acordarme también del grupo de “la quiniela”. Esas cañitas son siempre un aliciente para que llegue el viernes y echarnos unas risas. A los que ya he mencionado, Mabela, José María, y a Luis López, que en los últimos meses ha sido un gran apoyo y compañero de penurias en nuestra carrera por la consolidación.

A **grandes amigos**, que a pesar de vernos poco conseguimos que nuestra amistad perdure: Ricardo, Leandro, Fernando, Abel, Félix, Juanki, Ignacio, Laly, Ana de la Torre, Florence et David, Gonzalo y María, Chonco y Alicia. Y a Marta, la arquitecta de sueños, por tantos años de amistad y por hacerme sentir orgulloso de tener una amiga como ella.

A los **discípulos de Baco**: Marta y José Javier [y Thomas] por vuestra gran amistad, a Miguel Ángel, Hervé y Nicole, Paco, Maribel y demás amigos de Lavinia, por tantas botellas descorchadas y momentos excelentes.

A mis amigos “**quema-ruedas**” Delmonte, Villotaf, José Manuel, Garbi, Lucía, Gustavo, Emilio, Juan, Ricardo, Carlos, Mori... y un largo etc de gente estupenda con la que he compartido ruta y buenos momentos. Et mes grands amis du « *carreraclub* » qui me manquent vraiment: Jose, Lorenzo, Alain, Philippe, Fabrice, Albert, et leurs conjoints.

A toda mi **familia**, tíos y primos por su apoyo, a mi hermanita Diana que siempre será un orgullo para mí, ¡guapa!. A José Luis, y mis sobris Ainhoa y Mario, estos sí que son guapos !!!! estoy muy orgulloso de vosotros y aunque en el último año no os he visto con demasiada frecuencia no dejo de acordarme de

vosotros. Espero que la vida que tenéis por delante os lo ponga fácil y seáis muy felices.

A mis padres, que me lo han dado todo, la educación, los principios éticos, el apoyo y cariño eterno, los caprichos..... gracias mamá por tu fuerza y tu actitud que te ha hecho salir victoriosa en tu batalla contra el cáncer. Disfrutad a tope de vuestro viajes, vuestros cruceros y de este periodo que estáis viviendo juntos, que es bien merecido.

..... Non, je ne t'ai pas oublié, merci Marjorie pour toutes ces années des expériences et ces moments ensemble. Si je devais t'attribuer un groupe dans ces remerciements je devrais te mettre dans tous. Merci pour être professeur, collègue du labo, collaboratrice, grand amie, "quiniériste", disciple de Bacchus, des fois quema-ruedas, partenaire de voyage, de danse, "mère", infirmière
Merci ma belle !!

